

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY A EKOLOGIE



DIPLOMOVÁ PRÁCE

VLIV LÉČIVA NA ŽIVOTNÍ PROSTŘEDÍ

DRUG INFLUENCE ON THE ENVIRONMENT

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jitka Vytlačilová, Ph.D.

Vedoucí katedry: Prof. RNDr. Luděk Jahodář, CSc.

Hradec Králové 2012

Eva Musilová

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při práci čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Hradec Králové

.....

15. 5. 2012

podpis

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala RNDr. Jitce Vytlačilové, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady při zpracování této diplomové práce a v neposlední řadě patří velký dík mé rodině za podporu po celou dobu studia.

Tato práce vznikla za grantové podpory SVV UK 265 002.

Obsah

1.	Úvod	6
2.	Cíl práce	8
3.	Teoretická část.....	9
3.1	Léčivo a životní prostředí	9
3.1.1	Definice léčiva, léčivého přípravku a léčivé látky	9
3.1.2	Historický vývoj léčivých látek	9
3.1.3	Vstup léčiva do životního prostředí	10
3.2	Ekotoxikologie	15
3.2.1	Definice a vznik	15
3.2.2	Ekotoxicita	16
3.2.3	R-věty	17
3.2.4	Ekotoxikologické biotesty	18
3.2.5	Faktory ovlivňující toxicitu chemických látek	19
3.3	Karbamazepin	21
3.3.1	Historie	21
3.3.2	Terapeutické indikace	21
3.3.3	Farmakodynamika	22
3.3.4	Farmakokinetika	23
3.3.5	Vztah k životnímu prostředí	23
3.4	Provedené testy toxicity	24
3.4.1	Vícegenerační test s <i>Tetrahymena thermophila</i>	24
3.4.2	Test semichronické toxicity se semeny <i>Sinapis alba</i>	25
3.4.3	THAMNOTOXKIT F TM	26
3.5	Použité testovací organismy	27
3.5.1	<i>Tetrahymena thermophila</i> Nanney and McCoy	27
3.5.2	<i>Sinapis alba</i> L.	28
3.5.3	<i>Thamnocephalus platyurus</i> Packard	29
4.	Experimentální část	30
4.1	Použité pomůcky, přístroje a chemikálie	30
4.2	Vlastní provedení experimentů	32
4.2.1	Vícegenerační test s <i>Tetrahymena thermophila</i>	32
4.2.2	Test semichronické toxicity se semeny <i>Sinapis alba</i>	34

4.2.3	THAMNOTOXKIT F TM	35
5.	Výsledky	37
5.1	Vícegenerační test s <i>Tetrahymena thermophila</i>	37
5.2	Test semichronické toxicity se semeny <i>Sinapis alba</i>	39
5.3	THAMNOTOXKIT F TM	43
6.	Diskuze	46
7.	Závěr	52
8.	Seznam použitých zkratk	53
9.	Literatura.....	55
10.	Přílohy.....	63
10.1	Příloha I Přípravky obsahující karbamazepin obchodované v ČR.....	63
10.2	Příloha II Přípravky obsahující karbamazepin obchodované v USA	64
10.3	Příloha III Příklady generických přípravků karbamazepinu	66
10.4	Příloha IV Spotřeba léčiv s obsahem karbamazepinu v ČR	67
	Abstrakt	68
	Abstract.....	69

1. Úvod

Léčiva jsou určena především k udržení či navrácení zdraví jak lidí, tak i zvířat, bohužel tyto látky a též produkty jejich metabolické přeměny se v různé míře dostávají do životního prostředí. V největším měřítku se tak stává exkrecí těchto sloučenin pacienty a nesprávnou likvidací léčiv, v daleko menším procentu, avšak stále v množstvích ovlivňujících koncentrace dané látky v životním prostředí, také použitím čistírenských kalů v zemědělství a rovněž z odpadních vod nemocničních a farmaceutických výrobních zařízení [1, 2].

Dle databáze pro posouzení rizik léčiv na životní prostředí, vedenou National Centers for Coastal Ocean Science (NCCOS), jsou biologicky aktivní látky přítomny prakticky ve všech složkách prostředí v rozmezí nanogramů až miligramů v jednom litru téměř na všech místech planety [3].

Největší znečištění životního prostředí farmaky a jejich metabolity můžeme pozorovat ve vodách povrchových, především pak na středních a dolních tocích řek, které se nacházejí v hustě obydlených oblastech. Velkou roli zde hraje samozřejmě i množství a výkonnost čistíren odpadních vod a též úroveň zdravotnictví v dané oblasti. Nicméně v odpadních vodách se biologicky aktivní substance vyskytují v koncentracích pod 1 mg/l a můžeme je tak zařadit do stopového znečištění [3].

Některá farmaka jsou však vůči čistírenským procesům velmi odolná, kupříkladu poměrně perzistentní antiepileptikum karbamazepin, jeho degradační produkt nebo také klofibrová kyselina byly detekovány ve výtocích z čistíren odpadních vod, řekách, jezerech a dokonce i mořské vodě [2].

V České republice se stanovilo v rámci studie Výzkumného ústavu vodohospodářského T. G. Masaryka 5 nejvýznamnějších terapeuticky využívaných látek a to jednak z hlediska spotřeby získané z dat SÚKLu a jednak výskytu v odpadních vodách [4].

Pokud nebereme v úvahu látky hormonální povahy, které tvoří zvláštní skupinu, tak zmíněné nejfrekvencovanější účinné látky v našich odpadních vodách jsou tyto [4]:

- Diklofenak (spotřeba cca 20 tun/rok)
- Ibuprofen (spotřeba cca 200 tun/rok)
- Karbamazepin (spotřeba cca 7,5 tun/rok)
- Kyselina salicylová (spotřeba snad až 600 tun/rok)
- Kyselina klofibrová (spotřeba cca 10 tun/rok).

Jak již bylo řečeno, karbamazepin je extrémně stabilní molekulou, v čistírnách odpadních vod je zachycováno pouze 7-8 % jeho množství a tudíž dochází k jeho akumulaci v životním prostředí. Ve studii zkoumající 100 řek v 27 evropských zemích byla jeho přítomnost prokázána v 95 z nich [2, 5].

Toto léčivo však nebylo prokázáno pouze v povrchových vodách, ale bylo zjištěno, že může nenarušeně přetrvávat i ve vodách podzemních a to i po 8-10 let a zbytkové koncentrace byly stanoveny i ve zdrojích pitné vody [5].

Karbamazepin je téměř 50 let užíván především k léčbě různých druhů epilepsie, neuralgií či maniodepresivní psychózy a jeho postavení v léčbě těchto onemocnění je stále velmi významné, dokladem toho je například již uvedená roční spotřeba v ČR, 7500 kg [4, 6, 7, 8].

2. Cíl práce

Cílem této práce je pokusit se odhadnout vliv léčivého přípravku Timonil 300 retard a jeho účinné látky (karbamazepinu) jako standardu na životní prostředí. Toho se budeme snažit dosáhnout pomocí ekotoxikologických testů provedených na třech modelových organismech, zastupujících jednotlivé trofické úrovně, zvolenými experimenty jsou: vícegenerační test s prvokem *Tetrahymena thermophila*, test semichronické toxicity se semeny *Sinapis alba* a THAMNOTOXKIT FTM s korýšem *Thamnocephalus platyurus*.

3. Teoretická část

3.1 Léčivo a životní prostředí

3.1.1 Definice léčiva, léčivého přípravku a léčivé látky

Léčivo zákon č. 378/2007 Sb., o léčivech a o změnách některých souvisejících zákonů specifikuje jako léčivé přípravky a léčivé látky, přičemž léčivým přípravkem se rozumí a) látka nebo kombinace látek prezentovaná s tím, že má léčebné nebo preventivní vlastnosti v případě onemocnění lidí nebo zvířat, nebo b) látka nebo kombinace látek, kterou lze použít u lidí nebo podat lidem, nebo použít u zvířat či podat zvířatům, a to buď za účelem obnovy, úpravy či ovlivnění fyziologických funkcí prostřednictvím farmakologického, imunologického nebo metabolického účinku, nebo za účelem stanovení lékařské diagnózy [9].

Léčivé látky tentýž zákon definuje jako látky určené k tomu, aby byly součástí léčivého přípravku, které způsobují jeho účinek; tento účinek je zpravidla farmakologický, imunologický nebo spočívá v ovlivnění metabolismu [10].

3.1.2 Historický vývoj léčivých látek

Už od nepaměti se lidé snažili své zdraví udržet či ho navrátit, což je nutilo hledat prostředky, které by jim v tomto nelehkém úkolu pomohly, nejprve se samozřejmě využívala léčiva přírodní, k jejichž používání se dospělo metodami pokusů a omylů. Tato etapa, založená na empirii lidového léčitelství, v Evropě přetrvávala až do 16. století, využívala se především léčiva získaná sběrem a úpravou přírodnin, přičemž jejich složení bylo neznámé. K léčivům této takzvané 1. generace patřil například česnek, med, opium, některé alkaloidní drogy, síra a další [11].

S rozvojem přírodních věd v období renesance, zvláště pak alchymie, začal převažovat názor, že látky chemického charakteru jsou jako léčiva substancím přírodního původu rovnocenné. Předpokládalo se, že příčinou špatného fungování organismu jsou změny jeho chemického složení a je třeba tento stav napravit vhodnými chemickými prostředky [11, 12].

V tomto období, období iatrochemie, se nově mezi léčiva zařadily především sloučeniny anorganické, jako kupříkladu jednoduché sloučeniny arsenu, olova, železa, mědi, stříbra, zlata, síry a mnoha dalších. Organických látek se využívalo podstatně méně, získávaly se převážně jednoduchou izolací z přírodního materiálu, který se

vyznačoval vysokým obsahem účinné látky. Mezi zástupce této skupiny patří kyselina citronová, kyselina benzoová, kyselina vinná, glycerol, glukosa či sacharóza [11].

Přelomem v oblasti léčiv byla první syntéza organické sloučeniny a to močoviny, kterou provedl německý chemik Friedrich Wöhler zahříváním kyanatanu amonného roku 1828. Velký význam tohoto experimentu spočívá ve faktu, že do té doby přetrvávala takzvaná vitalistická teorie, podle které je ke vzniku organických látek potřebná vis vitalis, čili organické látky vznikají pouze díky činnosti živých organismů a nelze je tedy připravit uměle v laboratoři. Postupně začala přibývat léčiva známého složení a struktury - léčiva 2. generace, což bylo do té doby spíše výjimkou [11, 12].

Dalším pokrokem se stalo odmítnutí předpokladu, že biologicky aktivní produkty získané izolací z přírodních materiálů, jsou jako léčiva ideální a struktura účinných látek přírodního původu se začala modifikovat, vznikala tak léčiva 3. generace, toto označení je však platné i pro farmaka vzniklá obměnou již známých účinných látek připravených synteticky [11].

Organická syntéza se tedy stala hlavní součástí získávání nových léčivých látek, s rozvojem chemického a následně farmaceutického průmyslu se objem používaných léčiv začal rapidně zvyšovat. Zvláště výrazný pokrok nastal po 2. světové válce v přímé souvislosti s rychle se zvyšující úrovní vědeckého poznání a stále se rozmáhající průmyslovou výrobou. Biologicky aktivní substance v podobě léčiv tak postupně začaly představovat nezanedbatelný zdroj kontaminace životního prostředí [3, 11].

3.1.3 Vstup léčiva do životního prostředí

Léčiva se do životního prostředí dostávají různými cestami, nejvýznamnější je zajisté exkrece léčiv a jejich metabolitů pacienty, kteří jsou těmito medikamenty léčeni. V závislosti na jejich rozpustnosti ve vodě se dostávají do odpadních vod, nejvíce se to týká léčiv a jejich metabolitů ve vodě dobře rozpustných a tím pádem se vyskytujících v moči lidské a samozřejmě i zvířecí. V menší míře se biologicky aktivní látky a produkty jejich metabolické přeměny vylučují stolicí, tento způsob je charakterističtější především pro látky povahy lipofilní [2, 13].

Osud léčiva je tedy ve velké míře závislý na zpracování organismem, kterému se podává. V tomto hraje významnou roli metabolismus a eliminace biologicky aktivních substancí, což je přirozená cesta, jak se lidské či zvířecí tělo s danými látkami vypořádává, snaží se je detoxikovat a nejlépe zároveň z těla i odstranit. Nejdůležitějšími orgány jsou v tomto ohledu játra, ledviny, střeva a plíce [8, 13].

Většina substancí podléhá 2 fázím metabolických přeměn, fáze 1 zahrnuje zavedení nové funkční skupiny nebo demaskování skupiny již existující, reakce 1. fáze jsou nejčastěji typu oxidace, redukce, hydroxylace či hydrolýzy [8, 13].

Fázi 2 můžeme popsat jako reakce konjugační, zahrnují připojení funkční skupiny jako je acetyl, sulfát, glukuronová kyselina, glutathion či nějaká aminokyselina, což výrazně zvýší polaritu metabolizované sloučeniny a usnadní tak exkreci, neboť polárnější sloučeniny jsou vylučovány mnohem snadněji než látky rozpustné v lipidech [8, 13].

Nejdůležitějším eliminačním orgánem jsou tedy ledviny, polární metabolity jsou tudíž vylučovány především močí. Jinou významnou cestou eliminace léčiv je stolice, často se jejím prostřednictvím vylučují látky neabsorbované ze střeva nebo metabolity exkretované žlučí [3, 8, 13].

Léčiva se však neeliminují jen z těla lidí, ale nýbrž i zvířat, důležitá je tato skutečnost zvláště u chovů hospodářských zvířat, jelikož statková hnojiva se v zemědělství stále užívají k hnojení polí pro lepší růst pěstovaných rostlin a veterinární léčiva (či jejich metabolity) se tak mohou vyluhovat do půdy a posléze se dostat i do povrchových a podpovrchových vod. Do akvatických systémů se ale léčiva mohou dostávat i přímou cestou – prostřednictvím léčení ryb [2].

Jedním z dalších problémů jsou léčiva nespotřebovaná, která nejsou odevzdána do lékáren a z nich následně předána k řádné likvidaci spálením ve spalovnách nebezpečného odpadu specializovanými firmami. V domácnostech se mohou na jedné straně nacházet medikamenty s prošlou dobou použitelnosti a na straně druhé i léčiva stále použitelná, která ovšem už pacient nemá v úmyslu užívat z různých důvodů, jako je třeba změna medikace lékařem nebo plné vyléčení nemoci. Tyto přípravky nemálo obyvatel likviduje nesprávně s komunálním odpadem či domácími splašky a biologicky aktivní látky se tak mohou vyluhovat ze skládek anebo se přímo dostávají do odpadních vod kanalizací. Dle studií se například takto likviduje 33% prodaných léčiv v Německu a 25% v Rakousku [13].

Pokud se léčivo dostane do odpadních vod, jeho další osud závisí nejen na jeho stabilitě vůči přirozeným rozkladným procesům, ale také na tom, zda bude procházet přes čistírnu odpadních vod, tam se podle typu použité technologie může degradovat, avšak některá léčiva, jako kupříkladu karbamazepin či kyselina klofibrová, jsou odbouratelná díky své stabilní struktuře jen velmi těžce [2].

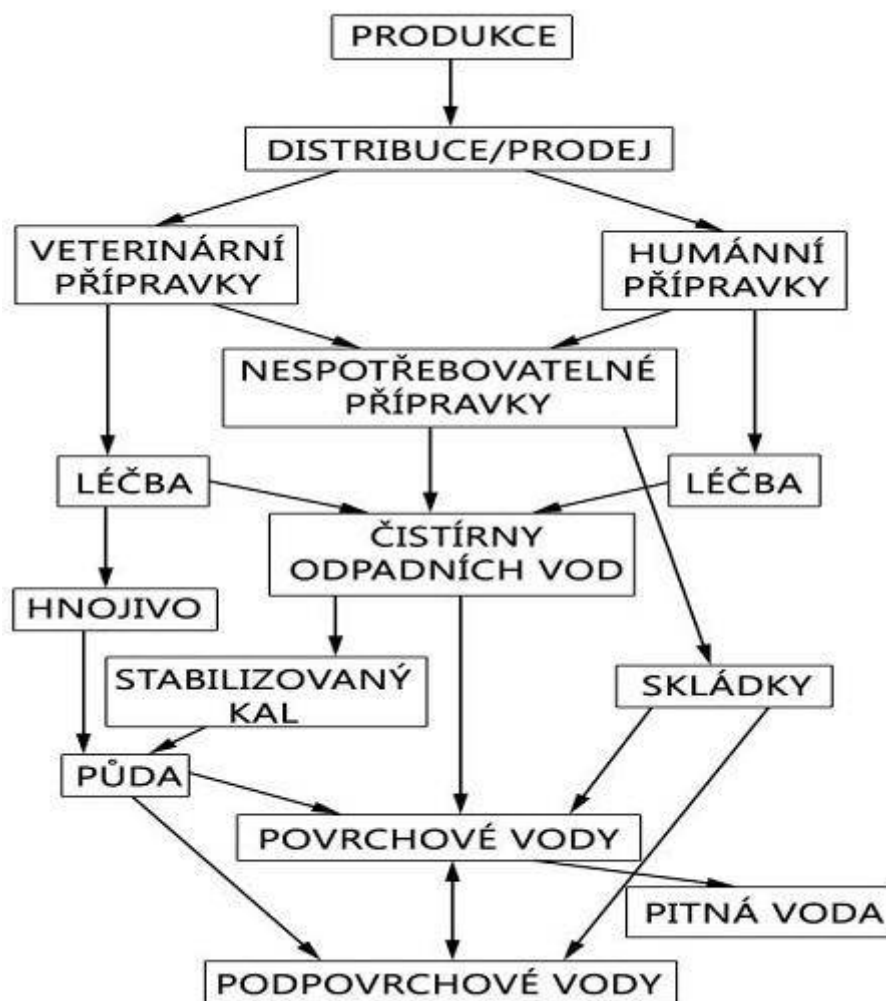
Pro vybrané země EU (Španělsko, Portugalsko, Francie, Belgie, Lucembursko, Nizozemí, Německo, Velká Británie, Řecko, Norsko, Švédsko, Finsko) platí, že 81 % populace, čili přibližně 270 milionů, je napojeno na kanalizaci. Mezi 85 % a 90 % obyvatel střední a severní Evropy a přibližně 50 % jižních zemí je obsluhováno čistírnami odpadních vod. Z tohoto můžeme usuzovat, že i v dnešní moderní době se do životního prostředí dostává nemalé množství léčiv prostřednictvím odpadních vod, které nejsou přes čistírny odpadních vod vedeny a koncentrace biologicky aktivních substancí se tak v tomto akvatickém prostředí nereguluje dostatečně, jak by bylo díky stávajícím technologiím možné [13].

Avšak účinnost čistíren odpadních vod vzhledem k farmakům, jak již bylo řečeno, také není stoprocentní, dokladem je zjištěná přítomnost přibližně sta sloučenin z mnoha skupin léčiv a některých z jejich metabolitů ve zpracovaných odpadních vodách, řekách a potocích, mořské, podzemní i pitné vodě. Ve výtocích čistíren odpadních vod jsou obecně koncentrace léčiv v řádu ng/l až µg/l, v řekách, jezerech a mořské vodě okolo µg/l [2].

Dle programu EU Poseidon zaměřeného na posuzování technologií odstraňování farmak a výrobků pro osobní hygienu v čistírnách pitné a splaškové vody, je výskyt léčiv v odpadních vodách v přímé souvislosti s jejich prodaným množstvím. Tento program se zabývá mimo jiné i vyhodnocením schopností vyspělých technologií úpravy odpadních vod, které se zavádějí s cílem snížit v nich objem vypouštěných léčiv [3, 5, 14].

Znečištění životního prostředí farmaky je nejvíce patrné právě ve vodách povrchových, zejména na středních a dolních tocích řek, které obklopují velké aglomerace. Vody podzemní jsou prozkoumány z tohoto hlediska mnohem méně, nicméně jejich znečištění je oproti předešlé skupině malé, je to dáno pravděpodobně jejich dobrou izolací způsobenou vrstvami s nízkým koeficientem propustnosti a dobrou sorpční schopností zemin, kterými tato voda proudí [3].

Další možností, jak se v životním prostředí mohou léčiva objevit, je z odpadních vod farmaceutických výrobních zařízení a nemocničních zařízení a také díky použití stabilizovaných čistírenských kalů jako druhotného hnojiva v zemědělství, kdy se biologicky aktivní látky mohou vyluhovat do půdy a následně opět do vod povrchových, podpovrchových, ale i vody pitné. Všechny tyto cesty však patří k menším zdrojům znečištění životního prostředí farmaky v porovnání s exkrecí léčiv a jejich metabolitů pacienty obecně [2, 3, 13].



Obr. 1: Pohyb léčiv a jejich metabolitů v životním prostředí [15]

Na základě odolnosti léčiv vůči životnímu prostředí, především v souvislosti s jejich fyzikálně-chemickými vlastnostmi, se farmaka dělí do 3 skupin [3]:

- látky odbouratelné lehce, jako například kyselina acetylsalicylová
- látky stálé s hydrofilní povahou
- látky stálé s lipofilní povahou.

U lipofilních léčiv tkví jejich nebezpečí v možnosti zapojení se těchto sloučenin do potravních řetězců, což je činí ve vztahu k životnímu prostředí nejrizikovějším typem látek [3].

Zvláštní podskupinou léčiv jsou tzv. EDC (endocrine disrupting compounds), což jsou xenobiotika, která mohou narušit fungování živého organismu napadáním žláz, které produkují hormony nebo samy účinky hormonů napodobují. V dnešní době jsou bezesporu nejznámějšími a nejvýznamnějšími představiteli této skupiny látky

s estrogenní aktivitou, které se díky celosvětovému používání hormonální antikoncepce dostávají do životního prostředí v nezanedbatelné míře. Je sice pravdou, že oproti jiným léčivým látkám se mohou nacházet v mnohem nižších koncentracích, ale je nutné si uvědomit, že právě tyto látky se vyznačují vysokou účinností, vždyť i terapeuticky se využívají ve velmi nízkých dávkách [3].

Jako další podskupinu léčiv lze uvést tzv. ICM (Iodinated X-ray contrast media) používané jako rentgen-kontrastní látky, tyto jsou vysoce odolné vůči jakýmkoli čistírenským procesům, tudíž je nynější konvenční technologie v uspokojivé míře neodstraňují a dostávají se tak do životního prostředí více než některá jiná léčiva [3].

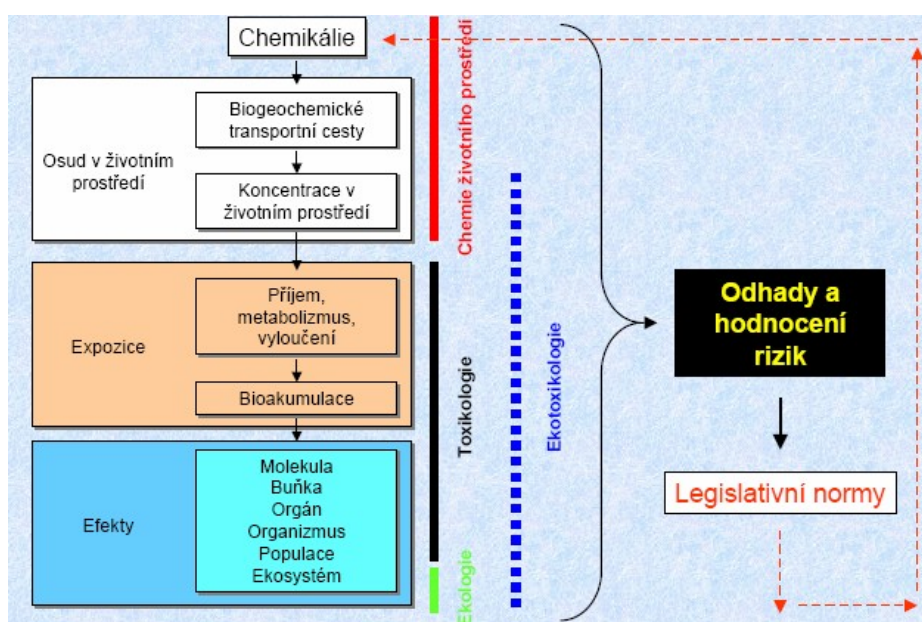
3.2 Ekotoxikologie

3.2.1 Definice a vznik

Termín ekotoxikologie byl poprvé použit roku 1969 Dr. René Truhautem, členem Francouzské akademie věd, který ji definoval jako odvětví toxikologie, které se zabývá toxickými vlivy přírodních a syntetických polutantů na složky ekosystémů – živočichy (včetně člověka), rostlinstvo a mikroorganismy [16].

Shromažďování informací týkajících se chemických látek v životním prostředí však započalo již dříve, největší rozmach nastal v 50. letech 20. století v souvislosti s rozvojem technologií dostatečně citlivých ke stanovení reziduí chemikálií v životním prostředí. V průběhu 60. let byly zjištěny sice nízké, ale ve velmi širokém měřítku se vyskytující koncentrace pesticidů v tělech ptáků, ryb a dalších organismů. Rachel Carson ve své knize *Silent Spring* z roku 1962 přisuzuje právě persistentním chemickým sloučeninám používaným v zemědělství různé škodlivé účinky na přirozené ekosystémy, což podnítilo výzkum v oblasti vlivu chemických substancí na životní prostředí, který samozřejmě pokračuje dodnes [17].

Ekotoxikologii můžeme popsat jako vědu interdisciplinární, propojuje přístupy ekologie, toxikologie a chemie životního prostředí, kombinuje zkoumání ekosystémů, především osud toxických a potenciálně toxických látek v ekosystémech a interakce chemických látek s organismy [16, 18].



Obr. 2: Charakteristika a význam ekotoxikologie [16]

Běžně ji využíváme k předpovídání účinků potenciálně škodlivých látek na ekosystémy a necílové druhy a dále ke studiu expozičních cest a příjmu chemických látek organismy [16, 18].

Za cíl má především chránit populace mnoha druhů a celá společenstva a zjišťovat případná rizika používaných chemických, ale i přírodních látek. K tomu by měly sloužit takové metody, které budou provedeny za standardních, reprodukovatelných podmínek a umožní nám tak srovnání výsledků z různých laboratoří [16, 18].

3.2.2 Ekotoxicita

Pro legislativní vymezení ekotoxicity v České republice je stěžejní vyhláška Ministerstva životního prostředí a Ministerstva zdravotnictví č. 376/2001 Sb., o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů a její Příloha č. 1 – Definice nebezpečných vlastností odpadů a kritéria hodnocení nebezpečných vlastností odpadů, podle které se ekotoxicita, jako nebezpečná vlastnost H14, definuje takto: tuto nebezpečnou vlastnost mají odpady, které představují nebo mohou představovat akutní nebo pozdní nebezpečí pro jednu nebo více složek životního prostředí [19].

Jako nebezpečný odpad se hodnotí ten, jehož vodný výluh ve zkouškách akutní toxicity uvedených v bodě 7 Přílohy č. 3 téže vyhlášky vykazuje pro alespoň jeden z testovacích organismů při určené době působení testovaného odpadu na testovací organismus $LC(EC, IC)_{50} \leq 10 \text{ ml/l}$ [19, 20].

Tabulka 1: Testovací organismy a délka působení vodných výluhů pro zkoušky akutní toxicity dle vyhlášky č. 376/2001 Sb. [19]

Testovací organismus	Doba působení v hodinách
<i>Poecilia reticulata</i> nebo <i>Brachydanio rerio</i>	96
<i>Daphnia magna</i>	48
<i>Raphidocelis subcapitata</i> (<i>Selenastrum capricornutum</i>) nebo <i>Desmodesmus subspicatus</i> (<i>Scenedesmus subspicatus</i>)	72
semeno <i>Sinapis alba</i>	72

Vyhláška specifikuje i pojmy LC_{50} , EC_{50} a IC_{50} a to následovně:

- LC_{50} jako koncentraci vodného výluhu odpadu, která způsobí úhyn 50 % testovacích ryb za daný časový úsek.

- EC₅₀ jako koncentraci vodného výluhu odpadu, která způsobí imobilizaci nebo úhyn 50 % testovacích organismů (*Daphnia magna*).
- IC₅₀ jako koncentraci vodného výluhu odpadu, která způsobí 50procentní inhibici růstu nebo růstové rychlosti řasové kultury nebo 50procentní inhibici růstu kořene *Sinapis alba* ve srovnání s kontrolou ve zvoleném časovém úseku [19].

Příloha č. 3 vyhlášky č. 376/2001 Sb. pod názvem Metody hodnocení nebezpečných vlastností odpadů se v bodě 7 věnuje metodám hodnocení nebezpečné vlastnosti H14 Ekotoxická, pro zkoušky akutní toxicity se používají tyto metody:

- ČSN EN ISO 6341 Jakost vod – Zkouška inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Zkouška akutní toxicity
- ČSN EN ISO 7346-2 Jakost vod - Stanovení akutní letální toxicity pro sladkovodní ryby [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] – část 2: Obnovovací metoda
- ČSN EN 28692 Jakost vod – Zkouška inhibice růstu sladkovodních řas *Scenedesmus subspicatus* a *Selenastrum capricornutum* (ISO 8692; 1989)
- Test inhibice růstu kořene hořčice bílé (*Sinapis alba*). Metodický pokyn Ministerstva životního prostředí ke stanovení ekotoxikity odpadů [20].

3.2.3 R-věty

Vyhláška Ministerstva průmyslu a obchodu č. 402/2011 Sb., o hodnocení nebezpečných vlastností chemických látek a chemických směsí a balení a označování nebezpečných chemických směsí, stanovuje mimo jiné i standardní věty označující specifickou rizikovost látky nebo směsi (R-věty) a to na základě Směrnice Rady 67/548/EHS [21, 22].

V příloze č. 6 této vyhlášky (Seznam standardních vět označujících specifickou rizikovost) nalezneme i R-věty týkající se vlivu chemických látek či směsí na životní prostředí [23]:

a) Jednoduché R-věty:

- R50 Vysoce toxický pro vodní organismy
- R51 Toxický pro vodní organismy
- R52 Škodlivý pro vodní organismy
- R53 Může vyvolat dlouhodobé nepříznivé účinky ve vodním prostředí

- R54 Toxický pro rostliny
- R55 Toxický pro živočichy
- R56 Toxický pro půdní organismy
- R57 Toxický pro včely
- R58 Může vyvolat dlouhodobé nepříznivé účinky v životním prostředí
- R59 Nebezpečný pro ozonovou vrstvu

b) Kombinované R-věty:

- R50/53 Vysoce toxický pro vodní organismy, může vyvolat dlouhodobé nepříznivé účinky ve vodním prostředí
- R51/53 Toxický pro vodní organismy, může vyvolat dlouhodobé nepříznivé účinky ve vodním prostředí
- R52/53 Škodlivý pro vodní organismy, může vyvolat dlouhodobé nepříznivé účinky ve vodním prostředí

Tabulka 2: Klasifikace chemických látek na základě akutní toxicity pro vodní organismy [24]

R-věta	LC(EC, IC) ₅₀
R50	$\leq 1\text{mg/l}$
R51	$1\text{mg/l až } \leq 10\text{mg/l}$
R52	$10\text{mg/l až } \leq 100\text{mg/l}$

Pro přiřazení dané R-věty musí chemická látka splňovat výše zmíněnou hodnotu LC(EC, IC)₅₀ u alespoň jednoho z testovacích organismů (totožné jako vodní organismy uvedené v tabulce 1) [24].

3.2.4 Ekotoxikologické biotesty

Ekotoxikologické biotesty jsou experimentální metodou, jenž se používá k hodnocení, zda testovaná chemická látka či směs bude za přesně definovaných expozičních podmínek mít vliv na testovací organismy, jak velký tento vliv bude a v obecnější rovině také pomáhají odhadnout možné účinky testované látky na životní prostředí [25, 26].

Ekotoxikologické biotesty můžeme dělit dle různých kritérií, například na základě [18, 25]:

- trofické úrovně testovacích organismů: testy s producenty, konzumenty a destruenty
- počtu testovacích organismů: testy jednodruhové a vícedruhové
- cílového ekosystému: sedimenty, půdní, sladkovodní, mořský
- testované matrice: sediment, půda, voda, odpad, chemická látka
- složitosti testovaného vzorku: přírodní vzorky, směsi látek, čisté chemické struktury
- způsobu přípravy vzorku: přímé testování například sedimentů, půdy, odpadních vod, testování výluhů či extraktů vzorků přírodních, definované koncentrace chemických látek
- doby expozice: testy akutní, semichronické a chronické
- pokročilosti designu testovacího systému: testy 1. generace (klasické testy s intaktními organismy), testy 2. generace (mikrobiotesty) a testy 3. generace (biosenzory, biosondy a biomarkery)
- stupně komplexnosti detekčního systému: enzymy, buněčné kultury, tkáňové kultury, organismy, populace a společenstva
- sledované odpovědi: efekty letální, subletální, hodnocení fyziologické či reprodukční aktivity.

3.2.5 Faktory ovlivňující toxicitu chemických látek

Způsob, jakým bude určitá chemická substance ovlivňovat životní prostředí, je velmi složitý, svou roli zde hraje množství faktorů, mezi něž patří [25]:

- a) vlastnosti látek chemicko-fyzikální – jako je koncentrace, rozpustnost ve vodě a v tucích, struktura dané látky či její perzistence v životním prostředí
- b) trvání a míra expozice
- c) environmentální faktory:
 - teplota prostředí – při vyšší teplotě dochází k rychlejšímu rozkladu degradabilních látek, urychluje se vstřebávání toxických látek i jejich metabolismus

- vlhkost vzduchu – polutanty se při vyšší vlhkosti snáze odstraňují ze vzduchu, zároveň však může vyšší vlhkost zvyšovat vstřebávání ve vodě dobře rozpustných látek a zvyšovat tak jejich toxicitu
- intenzita světla – zvyšuje se toxicita látek fototoxických, naopak látky citlivé na sluneční záření se rychleji degradují, světlo též ovlivňuje aktivitu rostlin, ty jsou obvykle méně citlivé při nižší intenzitě světla
- kvalita a kontaminace prostředí – pokud na organismy působí více stresových faktorů (jako například přítomnost různých chemických látek), jsou pak citlivější na další negativní vlivy prostředí

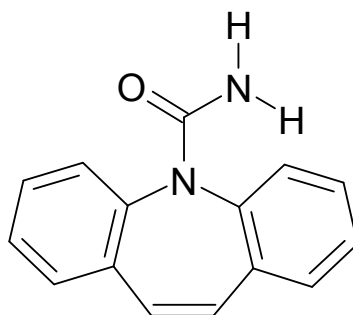
d) interakce mezi polutanty:

- účinky aditivní – látky vykazují ve směsi stejné toxické působení jako při individuálním kontaktu s organismem, výsledná toxicita bude součtem dílčích podílů jednotlivých látek směsi, tyto účinky mají zpravidla substance se stejným mechanismem účinku
- účinky synergické – toxicita směsi je výrazně vyšší, než by odpovídalo součtu toxicit jednotlivých látek
- účinky antagonistické – výsledná toxicita směsi je nižší než součet toxického působení jednotlivých složek směsi, důvodem mohou být chemicko-fyzikální vlastnosti látek či vyvolané biologické efekty

e) biologické faktory:

- testovaný biologický druh
- genetická proměnlivost daného druhu
- pohlaví
- stáří – různá vývojová stadia
- zdravotní stav
- faktory výživy.

3.3 Karbamazepin



Obr. 3: Chemická struktura karbamazepinu

3.3.1 Historie

Karbamazepin objevil chemik Walter Schindler roku 1953 ve švýcarské Basileji v laboratořích J. R. Geigy AG, které jsou nyní součástí společnosti Novartis, v roce 1960 pak provedl jeho syntézu [6].

Na trh bylo toto léčivo uvedeno roku 1962 k terapii neuralgie trigeminu. Jako antiepileptikum se karbamazepin začal užívat ve Velké Británii od roku 1965 a roku 1975 byl pak schválen i v USA [6].

Roku 1971 byl v Japonsku díky tehdejší nedostupnosti lithia poprvé zkoušen jeho vliv na manické stavy u pacientů refrakterních na antipsychotika, testy dopadaly slibně a začal se tudíž zkoumat jeho účinek na bipolární afektivní poruchu [6].

3.3.2 Terapeutické indikace

Karbamazepin je léčivo se širokým terapeutickým spektrem, užívá se k léčbě různých druhů epilepsie – fokálních záchvatů (nazývaných také simplexní parciální záchvaty), psychomotorických záchvatů (známé též jako komplexní parciální záchvaty), tonicko-klonických záchvatů (grand mal) a smíšených forem epilepsie [7, 8, 27].

U dospělých se jako počáteční dávka v těchto indikacích udává 300 mg/den, udržovací může být až 1200 mg/den, přičemž antiepileptická terapie je v zásadě dlouhodobá [27].

Dále lze toto léčivo použít při neuralgii trigeminu, genuinní (vrozené) neuralgii a též bolesti při diabetické neuropatii, zde se dávka zvyšuje od 150 mg/den až k ústupu bolesti, maximálně do 1200 mg/den, obvykle se však udržovací dávka pohybuje okolo

600 mg/den, po vymizení bolesti se v terapii pokračuje ještě několik týdnů, poté se postupně dávky snižují a ověřuje se tak, zda nedochází k návratu bolesti [7, 8, 27].

Také neepileptické záchvaty u roztroušené sklerózy se mohou stát důvodem jeho užití, patří mezi ně záchvaty bolesti, paroxysmální (záchvatovité) parestézie, tonické záchvaty, paroxysmální dysartrie (porucha artikulace) a ataxie (porucha koordinace pohybů) a samozřejmě i neuralgie trigeminu. Průměrná denní dávka je zde 300-900 mg [27].

Prevence záchvatů u alkoholového abstinčního syndromu, pouze však při současné hospitalizaci pacienta, vyžaduje 600 mg a v těžších případech i 1200 mg/den, postupně se dávkování snižuje a léčbu lze po 7-10 dnech ukončit [27].

Poslední indikací je léčba a profylaxe maniodepresivní psychózy, pokud selhává nebo je kontraindikována terapie lithiem či neuroleptiky, případně pokud se u pacientů léčených lithiem jednotlivé fáze střídají rychle. Iniciální dávkou je 300 mg, v případě nutnosti ji lze zvýšit až na 900 mg denně. Profylaxe bipolární poruchy je samozřejmě dlouhodobou záležitostí, tak jako léčba epilepsie [27].

Karbamazepin se užívá u dětí od 6 let, v případně nezbytnosti i u mladších, ale musí zde převažovat zisk terapie nad jejími riziky [27].

Zajímavou skutečností je zjištění, že osoby čínského a thajského původu jsou mnohem častěji než ostatní národnosti nositeli alely HLA-B*1502, která je silně spojena s rizikem Stevensova-Johnsonova syndromu, což je velmi závažná kožní reakce a vylučuje pokračování léčby karbamazepinem. Před počátkem terapie u těchto osob je tedy potřebné provést screening na zmíněnou alelu. Lze tedy předpokládat, že v těchto oblastech se bude karbamazepin k léčbě využívat méně a jeho výskyt v životním prostředí bude nižší než například v Evropě či Severní Americe [27].

Léčivé přípravky, jež se vyskytují na trhu v ČR a USA, jsou uvedeny v Příloze I a II této práce. Příloha III obsahuje různé generické názvy, pod kterými se karbamazepin jako léčivo vyrábí a obchoduje. Spotřeba léčiv s obsahem této účinné látky v ČR je uvedena v Příloze IV [28, 29, 30, 31, 32, 33].

3.3.3 Farmakodynamika

Karbamazepin, jakožto derivát dibenzoazepinu, má chemické vlastnosti podobné tricyklickým antidepresivům, farmakologicky je podobný fenytoinu, oba potlačují synaptické přenosy blokováním napětově řízených sodíkových kanálů, tím pak redukuje další přenosy konvulzivního výboje [8, 27].

Jeho účinek při neuralgiích trigeminu je dán pravděpodobně v důsledku inhibice synaptických přenosů vzruchu v míšních jádrech nervus trigeminus [27].

3.3.4 Farmakokinetika

Karbamazepin se metabolizuje především v játrech, kde se oxiduje, desaminuje, hydroxyluje a esterifikuje s kyselinou glukuronovou. V lidské moči bylo dosud izolováno jeho 7 metabolitů, v největší míře pak farmakologicky inaktivní 10,11-dihydroxy-10,11-dihydrokarbamazepin [27].

Při testech jednorázového perorálního podání bylo zjištěno, že asi 72 % podané dávky se vyloučilo ve formě metabolitů ledvinami, zbytek léčiva se vyloučil stolicí, část z toho v nemetabolizované formě. Jen 2-3 % části vyloučené močí tvoří původní substance [27].

3.3.5 Vztah k životnímu prostředí

Karbamazepin je velmi stabilní chemické povahy, v čistírnách odpadních vod je zachycován pouze ze 7-8 % a stále je hojně terapeuticky využíván, logaritmická hodnota rozdělovacího koeficientu K_{OW} dle Scheytta a kol., která charakterizuje rozpustnost ve vodě, u karbamazepinu činí 1,51, tato látka je tedy povahy lipofilní. Všechny tyto faktory přispívají k možné akumulaci karbamazepinu v životním prostředí [2, 25, 34].

Ve studii zkoumající sto řek v 27 zemích Evropy byla jeho přítomnost zjištěna dokonce v 95 % případů, největší střední koncentrace pak činila kolem 75 ng/l (nejvíce ze všech sledovaných léčiv), bylo též zjištěno, že tato biologicky aktivní látka může po dlouhou dobu přetrvávat ve vodách podzemních a to i po 8-10 let a zbytkové koncentrace byly stanoveny i ve zdrojích vody pitné [5, 15].

V povrchové vodě byl karbamazepin detekován až 1,2 µg/l, ve 44 řekách USA byla průměrná koncentrace 60 ng/l ve vodě a 4,2 ng/mg v sedimentu a například ve studii zabývající se hodnocením koncentrací léčiv ve výtocích osmi kanadských čistíren odpadních vod podél Atlantského oceánu byla zjištěna střední koncentrace karbamazepinu 79 ng/l [2, 35].

3.4 Provedené testy toxicity

3.4.1 Vícegenerační test s *Tetrahymena thermophila*

Tento test sleduje rychlost úbytku potravy v testovací kultuře prvoka *Tetrahymena thermophila*. Na počátku testu se do mikrotitrační destičky nadávkuje známé množství *Tetrahymena thermophila* a její potravy, populace těchto organismů inhibovaná roztokem zkoumané látky bude přijímat potravu nižší rychlostí oproti populaci kontrolní, která testované látky vystavena není, v testované kultuře bude tedy docházet ke zpomalení rychlosti úbytku potravy [25, 36].

Tetrahymena thermophila přijímá potravu konstantní rychlostí, srovnáním rychlosti úbytku potravy v testovaných koncentracích a v kontrole lze tedy hodnotit efekt zkoumané látky [25].

Množství potravy se stanoví pomocí spektrofotometrie jako množství zákalu. Test probíhá 24 hodin při teplotě 25 ± 5 °C za nepřístupu světla [36].

Inhibice v procentech se vypočítá podle následujícího schématu:

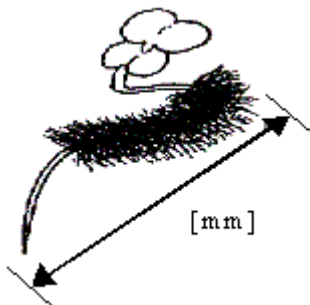
$$I = \left(1 - \frac{\Delta OD(t)}{\Delta OD(k)}\right) \times 100$$

$\Delta OD(t)$ představuje rozdíl naměřených optických hustot v čase T0 a T24 pro roztok testované látky, $\Delta OD(k)$ pak rozdíl naměřených optických hustot v čase T0 a T24 pro kontrolu [36].

3.4.2 Test semichronické toxicity se semeny *Sinapis alba*

V tomto testu se semena *Sinapis alba* kultivují v Petriho miskách na filtračním papíru, který je nasycen testovaným roztokem. Test probíhá po dobu 72 hodin při 20 °C bez přístupu světla [25, 37].

Hodnotí se zde vliv vodného roztoku na růst kořenů v počátečním stádiu vývoje této rostliny, srovnává se průměrná délka kořene u semen vystavených testované chemické látce s nárůstem kořene v kontrolách, kde jsou semena umístěna pouze v prostředí živného roztoku. Pro validitu testu musí semena v kontrole vykazovat klíčivost minimálně 90 % [25, 37].



Obr. 4: Měření délky kořene *Sinapis alba* [37]

Výpočet inhibice růstu kořene v procentech se provádí podle níže uvedeného schématu, přičemž $D(k)$ značí délku kořene v milimetrech v kontrole a $D(t)$ délku kořene v milimetrech u vodného roztoku testovaného vzorku [37].

$$I = \frac{D(k) - D(t)}{D(k)} \times 100$$

Tento test je snadno proveditelný a finančně nenáročný, má však jisté nevýhody. Na filtrační papír se mohou některé látky sorbovat a stát se tak pro semena nedostupnými, navíc papír absorbuje vodu a mění se tak koncentrace rozpuštěné látky. Je též sporné testování vodných výluhů rostlinou suchozemskou [25].

3.4.3 THAMNOTOXKIT F™

THAMNOTOXKIT F™ je akvatický test toxicity pro chemické láky, výluhy odpadů i odpadní vody, obsahuje vše potřebné k provedení standardizovaného a jednoduchého testu toxicity ve vodním prostředí (viz obr. 5) [38].



Obr. 5: Testovací sada THAMNOTOXKIT F™ [39]

K testování se využívá vývojové larvární stádium korýše *Thamnocephalus platyurus*, vylíhnuté z cyst. Test probíhá 24 hodin při 25 °C bez přístupu světla [25, 38].

Po proběhnutí testu se pod stereomikroskopem spočítají uhynulé larvy korýše, přičemž za uhynulé se považují takové larvy, které za 10 sekund pozorování nevykazují žádný pohyb. Zjistíme tak tedy procento mortality pro každou koncentraci testovaného roztoku [25, 38].

Pro validitu testu nesmí v kontrole, kde jsou larvy vystaveny pouze standardnímu roztoku, přesáhnout mortalita 10 % [38].

3.5 Použité testovací organismy

3.5.1 *Tetrahymena thermophila* Nanney and McCoy

Taxonomické zařazení [40]:

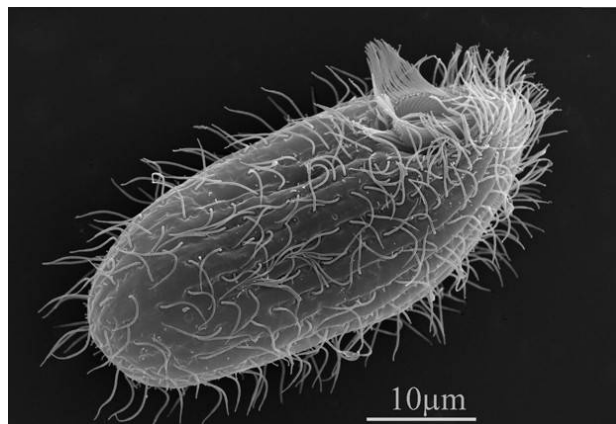
- říše: Protozoa (prvoci)
- kmen: Ciliophora (nálevníci)
- třída: Oligohymenophorea (chudoblanní)
- řád: Hymenostomatida
- čeleď: Tetrahymenidae
- rod: *Tetrahymena*.

Tetrahymena thermophila je obrvený jednobuněčný prvok vyskytující se ve sladkovodním prostředí, obývá potoky, jezera a rybníky v různých klimatických podmínkách [41].

Buňka tohoto organismu bývá 50 μm dlouhá a 20 μm široká, vyznačuje se, jako ostatní nálevníci, jadrovým dualismem, čili obsahuje 2 buněčná jádra – makrunukleus (jádro vegetativní) a mikronukleus (jádro generativní, sloužící k pohlavnímu rozmnožování) [41, 42].

Povrch buňky je opatřen množstvím brv, které slouží jak k pohybu, tak i k přihánění potravy k buněčným ústům. *Tetrahymena thermophila* se živí bakteriemi a je též velmi důležitou součástí benthické mikrofauny, kde se významně účastní recyklace organické hmoty [40].

Tetrahymena thermophila je často využívána jako model eukaryotické buňky pro studium molekulární a buněčné biologie [42].



Obr. 6: *Tetrahymena thermophila* [43]

3.5.2 *Sinapis alba* L.

Synonymum: *Leucosinapis alba* (L.) Spach, bělohořčice setá

Taxonomické zařazení [44]:

- říše: Plantae (rostliny)
- oddělení: Magnoliophyta (krytosemenné)
- třída: Magnoliopsida
- podtřída: Dilleniidae
- řád: Capparales
- čeleď: Brassicaceae (brukvovité).

Sinapis alba je jednoletá bylina se vzpřímenou, až 1,2 m vysokou lodyhou. Původní rostlinou je ve východní části Středozeří, dnes je však pěstována jako plodina v mírném pásu a subtropích celého světa. V našich podmínkách se pěstuje na polích od nižších poloh po vrchoviny [45].

Lodyha této rostliny je přímá, větvená a hustě štětinatě chlupatá. Listy jsou střídavé, řapíkaté a lyrovitě zpeřené. Květenstvím u této rostliny je hrozen, květy jsou pravidelné, čtyřčetné. *Sinapis alba* kvete běžně od května do července. Plodem je šešule, kde se nachází 2-8 semen, ta obsahují až 35% oleje, používají se jako koření a taktéž k výrobě hořčice [44, 45].



Obr. 7: *Sinapis alba* [46]

3.5.3 *Thamnocephalus platyurus* Packard

Taxonomické zařazení [40]:

- říše: Animalia (živočichové)
- kmen: Arthropoda (členovci)
- podkmen: Crustacea (korýši)
- třída: Brachiopoda (lupenonožci)
- řád: Anostraca (žábronožky)
- čeleď: Thamnocephalidae
- rod: *Thamnocephalus*.

Thamnocephalus platyurus je korýš vyskytující se v drobných (převážně stojatých) vodách Severní Ameriky a Mexika, v dospělosti dosahuje až 5 cm, jeho nauplia (larvální stádia) jsou však mikroskopických rozměrů [47].

Tělo dospělého jedince se vyznačuje protáhlým, mírně laterálně zploštělým tvarem a na rozdíl od jiných korýšů postrádá krunýř, což je společné pro všechny žábronožky. Na ventrální straně se nacházejí lupenité hrudní nožky, které slouží nejen k pohybu, ale také i k dýchání (nesou žábry) a k filtraci potravy. Pro pohyb těchto organismů je typické plavání hřbetem otočeným dolů, přetácejí se jen výjimečně, například při víření a filtraci sedimentu [40].



Obr. 8: *Thamnocephalus platyurus* – nauplius [48]

4. Experimentální část

4.1 Použité pomůcky, přístroje a chemikálie

Pomůcky

V experimentech byly použity následující pomůcky:

- laboratorní lžičky, váženky, kádinky, odměrné baňky
- Eppendorfovy zkumavky, stojan na zkumavky, mikropipety
- mikrotitrační destičky, makrotitrační destičky, Petriho misky
- filtrační papír, entomologická pinzeta, černý papír, milimetrový papír
- ochranné rukavice, rouška

Přístroje

Experimenty byly provedeny za použití následujících přístrojů:

- analytické digitální váhy KERN ABJ
- ultrazvuková lázeň SONOREX DIGITAL 10P
- třepačka VORTEX-GENIE 2
- box s laminárním prouděním BIO AIR AURA 2000 M.A.C
- TOXKIT INCUBATOR MicroBioTests Inc.
- inkubátor WTC BINDER
- reader ANTHOS 2010
- stereomikroskop LEICA EZ 4D
- počítač
- lednice

Chemické substance

- standard karbamazepinu p.a. od firmy Sigma-Aldrich
- tableta léčiva Timonil 300 retard
 - balení 50 tablet
 - držitel rozhodnutí o registraci: Desitin Arzneimittel GmbH, Hamburg
 - pomocné látky:
 - kopolymer kyseliny methakrylové a ethyl-akrylátu (1:1)
 - methakrylátový kopolymer typ RS PO
 - mikrokrytalická celulóza
 - sodná sůl karboxymethylškrobu (typ A)

- mastek
- koloidní bezvodý oxid křemičitý
- magnesium-stearát
- čištěná voda
- dichroman draselný $K_2Cr_2O_7$
- deionizovaná voda
- DMSO p.a.
- ředící voda pro test se semeny *Sinapis alba*
 - pro její přípravu jsme použili 4 základní roztoky (25 ml každého z následujících základních roztoků jsme odměřili do litrové odměrné baňky a doplnili do objemu 1000 ml deionizovanou vodou)
 - základní roztoky:
 - roztok $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (117,6 g/l)
 - roztok $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (49,3 g/l)
 - roztok $NaHCO_3$ (25,9 g/l)
 - roztok KCl (2,3 g/l)

4.2 Vlastní provedení experimentů

Každý experiment byl pro ověření správnosti průběhu pokusu opakován nejméně třikrát a zároveň byl proveden test s dichromanem draselným jako standardní testovanou látkou pro ověření citlivosti organismu.

Testovaná koncentrace účinné látky léčiva (Timonil 300 retard) odpovídala koncentraci standardu karbamazepinu.

Roztoky léčiva i standardu karbamazepinu u všech experimentů byly upraveny přidáním 1,5 obj. % DMSO a ponořeny do ultrazvukové lázně.

Výsledky byly zpracovávány pomocí programu GraphPad Prism 5 Project.

4.2.1 Vícegenerační test s *Tetrahymena thermophila*

Na analytických váhách jsme navázili jednotlivé testované látky a připravili jsme dvojkovým ředěním pomocí deionizované vody koncentrační řadu testovaných roztoků o 10 koncentracích karbamazepinu a dichromanu (viz tabulka 3).

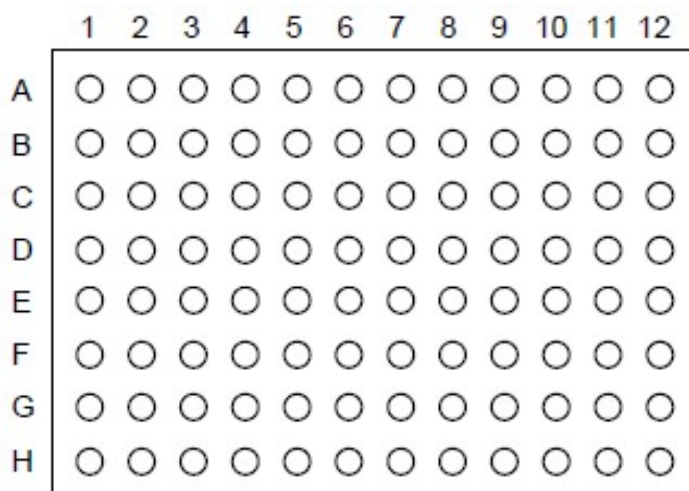
Tabulka 3: Koncentrace karbamazepinu a $K_2Cr_2O_7$ v jednotlivých připravených roztocích

Roztok č.	Koncentrace karbamazepinu v mg/l	Koncentrace $K_2Cr_2O_7$ v mg/l
1	1000,00	288,00
2	500,00	144,00
3	250,00	72,00
4	125,00	36,00
5	62,50	18,00
6	31,25	9,00
7	15,63	4,50
8	7,81	2,25
9	3,91	1,13
10	1,95	0,56

V boxu s laminárním prouděním jsme naplnili mikrotitrační destičku podle následujícího schématu (viz též obr. 9) :

- 1. řada (B2-B11): 150 μ l peptonu
- 2. řada (C2-C11): 100 μ l peptonu + 50 μ l roztoku testované látky (dávkováno sestupně od nejvyšší koncentrace)

- 3. řada (D2-D11): 100 µl peptonu + 50 µl suspenze *Tetrahymena thermophila* (kontrolní řada)
- 4. až 6. řada (E2-G11): 50 µl peptonu + 50 µl roztoku testované látky dle jednotlivých koncentrací + 50 µl suspenze *Tetrahymena thermophila* (3 paralelní stanovení)



Obr. 9: Schéma mikrotitrační destičky

Po naplnění destičky jsme pomocí readru změřili optickou hustotu při vlnové délce 492 nm a dali ji do inkubátoru udržujícího teplotu 25 °C, po 24 hodinách inkubace za nepřístupu světla jsme znovu změřili optickou hustotu při téže vlnové délce.

Spočítali jsme procenta inhibice pro jednotlivé koncentrace testovaných látek podle již zmíněného vzorce:

$$I = \left(1 - \frac{\Delta OD(t)}{\Delta OD(k)}\right) \times 100$$

a stanovili hodnotu 24hIC₅₀.

4.2.2 Test semichronické toxicity se semeny *Sinapis alba*

Na analytických váhách jsme navážili jednotlivé testované látky a připravili jsme pomocí ředící vody (složení uvedené výše) koncentrační řadu testovaných roztoků o 10 koncentracích karbamazepinu a o 7 koncentracích dichromanu (viz tabulka 4).

Tabulka 4: Koncentrace karbamazepinu a $K_2Cr_2O_7$ v jednotlivých připravených roztocích

Roztok č.	Koncentrace karbamazepinu v mg/l	Koncentrace $K_2Cr_2O_7$ v mg/l
1	1000,00	200,00
2	500,00	100,00
3	250,00	75,00
4	125,00	50,00
5	62,50	30,00
6	31,25	20,00
7	15,63	10,00
8	7,81	-
9	3,91	-
10	1,95	-

Do Petriho misek jsme vložili filtrační papír, nasýtili ho 5 ml zkoumaného roztoku a vložili na něj 10 semen *Sinapis alba*. Pro každou koncentraci testovaného roztoku i pro tzv. kontrolu (filtrační papír zde nasycen 5 ml ředící vody) jsme provedli 3 paralelní nasazení.

Petriho misky jsme vložili do inkubátoru do tmy na 72 hodin při teplotě 20 °C.

Po skončení inkubace jsme pomocí milimetrového papíru opatrně změřili délku kořenů, zjistili aritmetický průměr ze tří paralelních měření a z něj spočítali procenta inhibice růstu kořenů dle již uvedeného vzorce:

$$I = \frac{D(k) - D(t)}{D(k)} \times 100$$

a stanovili hodnotu 72hIC₅₀.

4.2.3 THAMNOTOXKIT FTM

Připravili jsme standardní roztok ze solných roztoků, které jsou součástí testovací sady THAMNOTOXKIT FTM, do litrové odměrné baňky jsme nalili 800 ml deionizované vody, přidali lahvičku roztoku NaHCO₃, 2 lahvičky roztoku CaSO₄ a po jedné lahvičce roztoku MgSO₄ a roztoku KCl, doplnili do 1000 ml deionizovanou vodou a vše důkladně protřepali. Před použitím jsme tento roztok 15 minut provzdušňovali.

24 hodin před zahájením testu jsme do zkumavky s cystami přidali 1 ml standardního roztoku, který jsme předem zředili v poměru 1:8 deionizovanou vodou, vše promíchali a po 30 minut lehce protřepávali, započali jsme tak líhnutí cyst.

Na Petriho misku jsme přenesli obsah zkumavky, přidali 10 ml zředěného standardního roztoku, lehce promíchali a dali do inkubátoru pod souvislé osvětlení při teplotě 25 °C až do zahájení experimentu.

Pomocí standardního roztoku jsme připravili koncentrační řadu testovaných roztoků o 6 koncentracích karbamazepinu a dichromanu (viz tabulka 5).

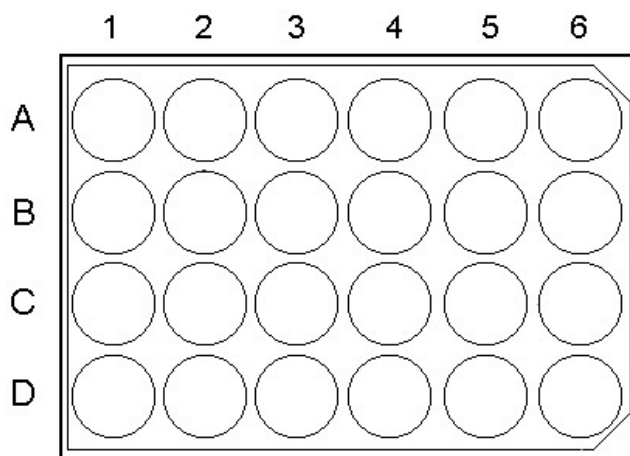
Tabulka 5: Koncentrace karbamazepinu a K₂Cr₂O₇ v jednotlivých připravených roztocích

Roztok č.	Koncentrace karbamazepinu v mg/l	Koncentrace K₂Cr₂O₇ v mg/l
1	1000,00	2,00
2	666,67	1,00
3	444,44	0,50
4	296,30	0,25
5	197,53	0,13
6	131,69	0,06

Naplnili jsme 24jamkovou makrotitrační destičku podle následujícího schématu (viz též obr. 10):

- 1. sloupec: 1 ml standardního roztoku (kontrolní sloupec)
- 2. až 6. sloupec: 1 ml testovaných roztoků dávkováno sestupně od nejvyšší koncentrace (3 paralelní stanovení, ve sloupci je vždy stejná koncentrace testovaného roztoku)

- do každé jamky řady D (tzv. ředící jamky) jsme pomocí mikropipety přemístili 50 vylíhnutých larev *Thamnocephalus platyurus*
- z ředících jamek jsme do každé jamky v rámci téhož sloupce přemístili po 10 larvách



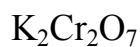
Obr. 10: Schéma 24jamkové makrotitrační destičky [38]

Makrotitrační destičku jsme po naplnění umístili na 24 hodin do inkubátoru při 25 °C bez přístupu světla.

Po skončení inkubace jsme pod stereomikroskopem spočítali uhynulé larvy v každé jamce (kromě ředících), zjistili % mortality pro každou koncentraci testované látky a stanovili hodnotu 24hLC₅₀.

5. Výsledky

5.1 Vícegenerační test s *Tetrahymena thermophila*



Při testu se standardním toxinem dichromanem draselným jsme pomocí programu GraphPad Prism 5 Project nelineární regresní analýzou stanovili hodnotu střední inhibiční koncentrace: $24\text{hIC}_{50} = 16,73 \text{ mg/l}$ (15,58-17,98 mg/l).

Karbamazepin standard a karbamazepin v léčivu

V tabulce 6 jsou uvedeny reálné koncentrace karbamazepinu v jednotlivých roztocích. V tabulkách 7 a 8 jsou uvedena procenta inhibice při testech s karbamazepinem jako standardem a karbamazepinem v léčivu.

Tabulka 6: Reálné koncentrace karbamazepinu v daných roztocích

Roztok č.	Reálná koncentrace v mg/l
1	333,33
2	166,67
3	83,33
4	41,67
5	20,83
6	10,42
7	5,21
8	2,60
9	1,30
10	0,65

Tabulka 7: Průměrná inhibice (%) v jednotlivých koncentracích při testu se standardem karbamazepinu

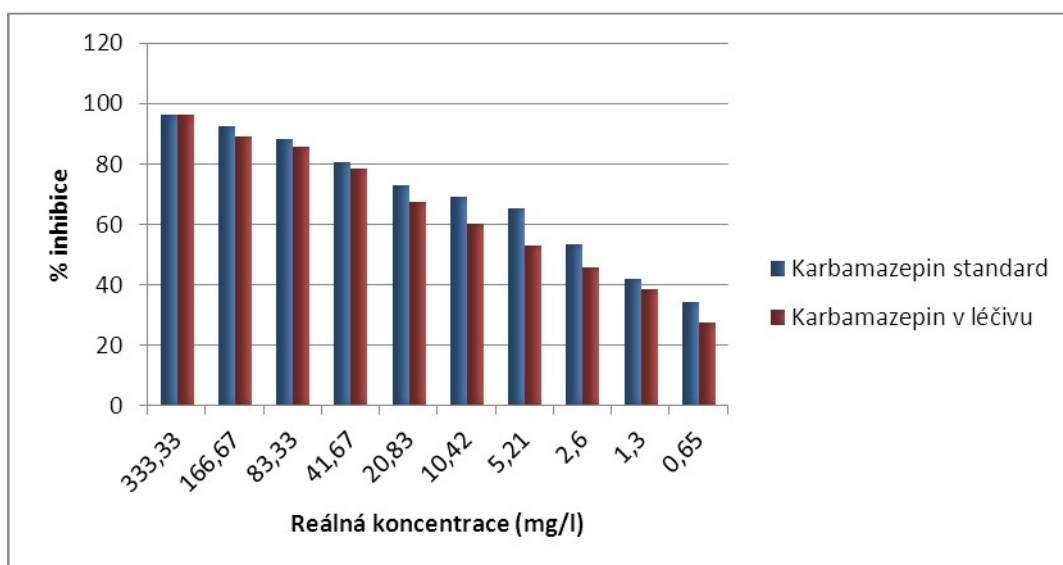
1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.
96,12	92,25	88,37	80,62	72,87	68,99	65,12	53,49	41,86	34,11

Při experimentu se standardem karbamazepinu jsme stanovili hodnotu střední inhibiční koncentrace: $24\text{hIC}_{50} = 2,20 \text{ mg/l}$ (1,94-2,48 mg/l).

Tabulka 8: Průměrná inhibice (%) v jednotlivých koncentracích při testu s karbamazepinem v léčivu

1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.
96,38	89,13	85,51	78,26	67,39	60,14	52,90	45,65	38,41	27,54

Při experimentu s karbamazepinem jako součástí léčiva jsme stanovili hodnotu střední inhibiční koncentrace: $24hIC_{50} = 3,93 \text{ mg/l}$ (3,49-4,42 mg/l).



Obr. 11: Graf srovnání průměrné procentuální inhibice karbamazepinu jako standardu a karbamazepinu v léčivu

5.2 Test semichronické toxicity se semeny *Sinapis alba*

Kontrola

Naměřené délky kořenů v kontrole v milimetrech shrnuje tabulka 9, průměrná hodnota délky kořene je 41,72 mm.

Tabulka 9: Délka kořene v kontrole v mm

1.	46	36	45	40	39	41	39	43	45	41
2.	42	40	48	38	43	42	36	45	50	35
3.	46	33	44	40	42	47	34	41	48	42

$K_2Cr_2O_7$

V tabulce 11 jsou pro jednotlivé koncentrace roztoků $K_2Cr_2O_7$ (viz tabulka 10) uvedeny průměrné hodnoty naměřených délek kořenů v milimetrech z každé Petriho misky, tedy průměr z 10 vyklíčených semen *Sinapis alba*. V tabulce 12 je pak uvedena průměrná procentuální inhibice růstu kořene.

Tabulka 10: Reálné koncentrace $K_2Cr_2O_7$ v mg/l v daných roztocích

Roztok č.	Koncentrace $K_2Cr_2O_7$ v mg/l
1	200,00
2	100,00
3	75,00
4	50,00
5	30,00
6	20,00
7	10,00

Tabulka 11: Průměrné délky kořenů v mm při testu s $K_2Cr_2O_7$

1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
3,70	7,80	9,70	12,70	16,00	21,10	26,70
3,90	7,30	9,80	12,50	15,60	21,30	26,33
3,60	7,70	9,50	12,40	15,70	21,00	26,10

Tabulka 12: Průměrná inhibice (%) růstu kořene při testu s $K_2Cr_2O_7$

1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
91,05	81,78	76,83	69,96	62,21	49,34	36,77

Při testu se standardním toxinem dichromanem draselným jsme stanovili hodnotu střední inhibiční koncentrace: $72hIC_{50} = 18,96 \text{ mg/l}$ (18,18-19,78 mg/l), což je v souladu s metodickým pokynem Ministerstva životního prostředí ke stanovení ekotoxicity odpadů [49].

Karbamazepin standard a karbamazepin v léčivu

V tabulce 13 jsou uvedeny reálné koncentrace karbamazepinu v jednotlivých roztocích. Tabulky 14 a 15 ukazují průměrné hodnoty naměřených délek kořenů v milimetrech z každé Petriho misky u testů se standardem karbamazepinu a karbamazepinem jako součástí léčiva.

Tabulka 13: Reálné koncentrace karbamazepinu v daných roztocích

Roztok č.	Koncentrace karbamazepinu v mg/l
1	1000,00
2	500,00
3	250,00
4	125,00
5	62,50
6	31,25
7	15,63
8	7,81
9	3,91
10	1,95

Tabulka 14: Průměrné délky kořenů v mm při testu se standardem karbamazepinu

1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.
10,10	14,20	19,56	24,90	33,33	35,50	37,20	39,00	40,30	41,10
9,90	14,80	19,60	25,13	33,78	35,30	37,33	40,40	41,30	41,56
9,78	15,00	18,90	24,75	33,80	35,80	36,00	38,11	39,44	41,22

Tabulka 15: Průměrné délky kořenů v mm při testu s karbamazepinem v léčivu

1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.
10,80	13,44	16,00	24,60	29,70	31,10	38,00	39,10	40,13	41,00
10,30	13,80	16,67	25,00	31,10	32,50	35,70	37,44	39,80	41,70
10,78	14,00	17,90	25,90	30,80	32,44	36,78	38,89	39,90	40,70

V tabulkách 16 a 17 jsou uvedeny průměrné procentuální inhibice při testech s karbamazepinem jako standardem a karbamazepinem v léčivu.

Tabulka 16: Průměrné inhibice (%) v jednotlivých koncentracích při testu se standardem karbamazepinu

1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.
76,21	64,84	53,61	40,25	19,37	14,83	11,68	6,11	3,28	1,02

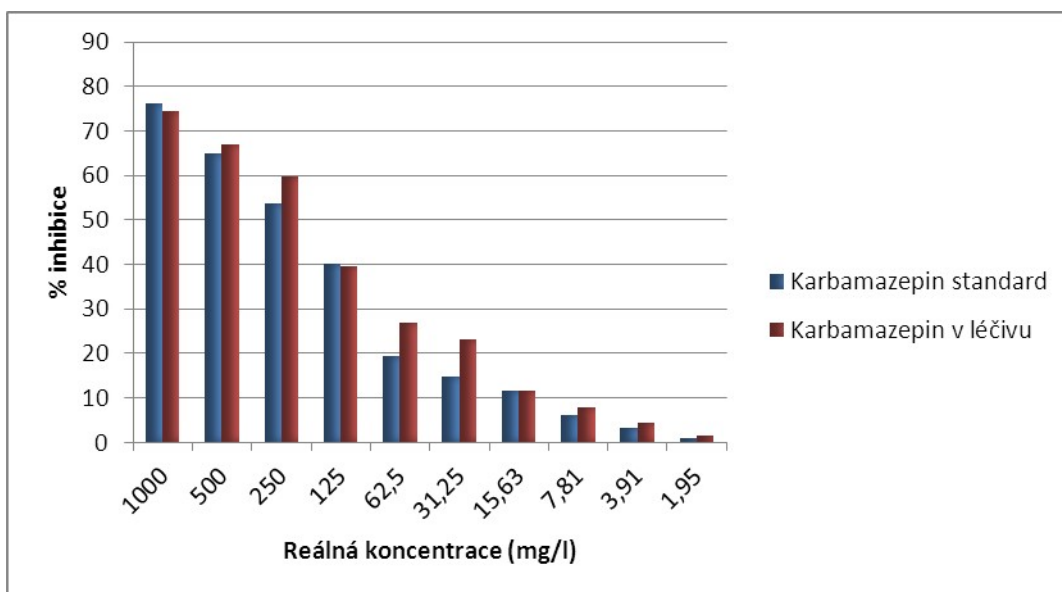
Při experimentu se standardem karbamazepinu jsme stanovili hodnotu střední inhibiční koncentrace: $72hIC_{50} = 232,7 \text{ mg/l}$ (216,1-250,5 mg/l).

Tabulka 17: Průměrné inhibice (%) v jednotlivých koncentracích při testu s karbamazepinem v léčivu

1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.
74,53	67,05	59,60	39,68	26,81	23,26	11,73	7,77	4,26	1,40

Při experimentu s karbamazepinem jako součástí léčiva jsme stanovili hodnotu střední inhibiční koncentrace: $72hIC_{50} = 195,9 \text{ mg/l}$ (179,6-213,5 mg/l).

Na následující straně je uveden graf srovnání průměrné procentuální inhibice standardu karbamazepinu a karbamazepinu jako součástí léčiva na růst kořene *Sinapis alba*.



Obr. 12: Graf srovnání průměrné procentuální inhibice karbamazepinu jako standardu a karbamazepinu v léčivu

5.3 THAMNOTOXKIT FTM

Kontrola

V kontrole jsme stanovili mortalitu 0%.

K₂Cr₂O₇

Tabulka 18 znázorňuje reálné koncentrace K₂Cr₂O₇ v jednotlivých připravených roztocích, v tabulce 19 je uvedena zjištěná průměrná mortalita v procentech pro jednotlivé roztoky při testu se standardním toxinem K₂Cr₂O₇.

Tabulka 18: Reálné koncentrace K₂Cr₂O₇ v daných roztocích

Roztok č.	Koncentrace K ₂ Cr ₂ O ₇ v mg/l
1	2,00
2	1,00
3	0,50
4	0,25
5	0,13
6	0,06

Tabulka 19: Průměrná mortalita (%) při testu s K₂Cr₂O₇

1.	2.	3.	4.	5.	6.
90	90	50	10	0	0

Při experimentu s dichromanem draselným jsme stanovili hodnotu střední letální koncentrace: 24hLC₅₀ = 0,156 mg/l (0,114-0,213 mg/l), což odpovídá požadavkům na citlivost metody testu THAMNOTOXKIT FTM.

Karbamazepin standard a karbamazepin v léčivu

V tabulce 20 jsou uvedeny reálné koncentrace karbamazepinu v jednotlivých roztocích. V tabulkách 21 a 22 je pak uvedena průměrná mortalita v % při testech se standardem karbamazepinu a karbamazepinem v léčivu.

Tabulka 20: Reálné koncentrace karbamazepinu v daných roztocích

Roztok č.	Koncentrace karbamazepinu v mg/l
1	1000,00
2	666,67
3	444,44
4	296,30
5	197,53
6	131,69

**Tabulka 21: Průměrná mortalita (%) v jednotlivých koncentracích při testu se
standardem karbamazepinu**

1.	2.	3.	4.	5.	6.
76,67	60,00	46,67	3,33	0	0

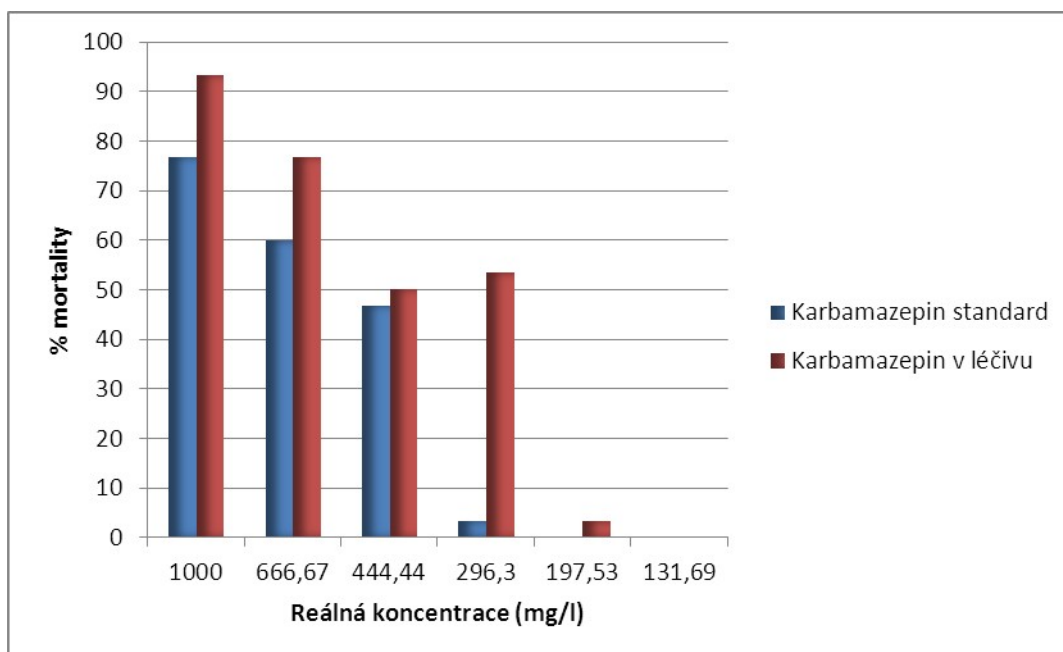
Při experimentu se standardem karbamazepinu jsme stanovili hodnotu střední letální koncentrace: $24hLC_{50} = 563,5 \text{ mg/l}$ (505,7-627,9 mg/l).

**Tabulka 22: Průměrná mortalita (%) v jednotlivých koncentracích při testu
s karbamazepinem v léčivu**

1.	2.	3.	4.	5.	6.
93,33	76,67	50,00	53,33	3,33	0

Při experimentu s karbamazepinem jako součástí léčiva jsme stanovili hodnotu střední letální koncentrace: $24hLC_{50} = 388,1 \text{ mg/l}$ (338,1-444,6 mg/l).

Na následující straně je uveden graf srovnání vlivu standardu karbamazepinu a karbamazepinu jako součástí léčiva na mortalitu larev *Thamnocephalus platyurus* v procentech.



Obr. 13: Graf srovnání průměrné procentuální mortality standardu karbamazepinu a karbamazepinu v léčivu

6. Diskuze

Odhad vlivu léčiva na životní prostředí je velmi složitý, musíme si uvědomit, že pokud máme určitý ekosystém a začneme ho zatěžovat novou chemikálií nebo většími koncentracemi chemických látek v něm běžně obsažených, velmi pravděpodobně se to v nějaké jeho části projeví – ať už v oblasti producentů, konzumentů či destruentů, nakonec i ovlivnění pouze jedné skupiny může mít dopad na ostatní trofické úrovně, rovnováha ekosystému se může narušit.

Samozřejmě míra ovlivnění organismů je různá, na některé daná chemická látka vůbec působit nemusí, pro další se může stát silně toxickou a pro jiné naopak může být její působení přínosné.

Výsledný vliv určité chemické substance na daný organismus je vždy kombinací účinků na tento organismus i na druhy další, jde o vliv na celý ekosystém, jeho jednotlivé součásti a vztahy mezi nimi.

V této práci zkoumali účinnou látku karbamazepin, ten je v terapeutické praxi již od roku 1962. Jeho struktura je velmi stabilní a tudíž odolná vůči rozkladu, dochází tedy k perzistenci této chemické substance v životním prostředí. Ačkoli se močí v nezměněné formě vylučuje pouze ze 2-3 % podané dávky, detekovatelné koncentrace této látky byly velmi často prokázány jak v povrchových, tak dokonce i v podzemních vodách [2, 6, 27].

Kümmerer uvádí koncentraci karbamazepinu v povrchových vodách až 1200 ng/l, v řekách jižní Francie byly zjištěny koncentrace karbamazepinu 208-416 ng/l ve vodách přitékajících do čistíren odpadních vod a koncentrace 112-258 ng/l v jejich výtocích, je tedy zřejmé, že čistírenské procesy neodstraňují tuto léčivou látku dostatečně, v této studii byly detekovány i metabolity karbamazepinu, které byly prokázány v moči (karbamazepin-10,11-epoxid, 10-hydroxy-10,11-dihydrokarbamazepin, 10,11-dihydro-10,11-*trans*-dihydroxykarbamazepin, 2-hydroxykarbamazepin, iminostilben, akridin a akridon), kromě iminostilbenu byla zjištěna přítomnost všech zkoumaných látek, přičemž v největším zastoupení 10,11-dihydro-10,11-*trans*-dihydroxykarbamazepin s koncentracemi 311-1415 ng/l, tato látka je však společným metabolitem karbamazepinu a oxkarbamazepinu, jenž je taktéž léčebně využíván, proto jsou detekované hodnoty vyšší než u karbamazepinu jako parentní látky [2, 50].

Data z monitorování Povodí Labe dle sdělení Ing. Martina Ferenčíka ukazují výskyt karbamazepinu v této oblasti v koncentracích 50-100 ng/l podle velikosti toku a jeho zatížení čistírnami [51].

V povodí Perlové řeky v jižní Číně byl karbamazepin detekován v 81 % se střední koncentrací 15,6 ng/l. Ve Velké Británii ve studii zkoumající řeky Ray, Ouse a Adur dosahovala koncentrace karbamazepinu až 290 ng/l. Ve španělských řekách Henares, Jarama a Tajo byl zjištěn výskyt této účinné látky v 80 % vzorků s rozmezím koncentrací 0,3-104,0 ng/l. V rozsáhlejší studii sta řek Evropy činila nejvyšší střední koncentrace kolem 75 ng/l a ve studii 44 řek USA pak 60 ng/l [15, 35, 52, 53, 54].

Výskyt karbamazepinu v odpadních vodách tedy není ničím neobvyklým, jeho detekované koncentrace z velké části odrážejí míru terapeutického využití tohoto léčiva v dané oblasti.

Zjištěné koncentrace karbamazepinu mohou mít vliv na organismy, které jsou působení tohoto farmaka vystaveny. Cílem této práce bylo odhadnout vliv léčivé látky karbamazepinu jako standardu a karbamazepinu v jednom z léčivých přípravků používaných v České republice na životní prostředí. Toho jsme se snažili dosáhnout prostřednictvím testů toxicity provedených na zástupcích třech trofických úrovní. K testování byly využity 2 testy semichronické a jeden test akutní.

Při semichronickém vícegeneračním testu toxicity s prvokem *Tetrahymena thermophila*, jako zástupcem destruentů, byla zjištěna hodnota $24hIC_{50} = 2,20$ mg/l (1,94-2,48 mg/l) a TU 45,45 při testu se standardem karbamazepinu a hodnota $24hIC_{50} = 3,93$ mg/l (3,49-4,42 mg/l) a TU 25,45 při testu s karbamazepinem v léčivu. Standard karbamazepinu se tedy jeví pro zmíněný testovací organismus jako více škodlivý nežli léčivo s obsahem této účinné látky, rozdíl výsledných středních inhibičních koncentrací však není příliš vysoký, může být způsoben mírnou stimulací testovacího organismu pomocnými látkami léčiva či vzájemným ovlivněním jednotlivých složek léčivého přípravku na výsledné působení jakožto směsi na testovací organismus.

Další semichronický test byl proveden se semeny *Sinapis alba*, jako zástupcem producentů. Pro standard karbamazepinu byla získána hodnota $72hIC_{50} = 232,7$ mg/l (216,1-250,5 mg/l) a TU 0,43, pro léčivo s účinnou látkou karbamazepin hodnota $72hIC_{50} = 195,9$ mg/l (179,6-213,5 mg/l) a TU 0,51. Zde je situace odlišná, léčivo na daný testovací organismus působí více inhibičně, než na něj působí léčivá látka samotná, je tedy možné, že pomocné látky obsažené v tabletě léčivého přípravku mají na sledovaný parametr vliv taktéž inhibiční nebo mohou podporovat působení samotné

účinné látky, opět je zde léčivo jako směs látek, proto se chová odlišně od standardu léčivé látky.

Posledním zvoleným testem byl test akutní s korýšem *Thamnocephalus platyurus*, zástupcem konzumentů. THAMNOTOXXKIT FTM přinesl tyto výsledky: hodnotu 24hLC₅₀ = 563,5 mg/l (505,7-627,9 mg/l) a TU 0,18 při testu se samotnou léčivou látkou a hodnotu 24hLC₅₀ = 388,1 mg/l (338,1-444,6 mg/l) a TU 0,26 při testu s léčivem. Léčivý přípravek zde také vychází jako více toxický pro testovací organismus, opět pravděpodobně díky přítomnosti látek pomocných.

Jako nejvíce citlivý druh z testovacích organismů použitých v této práci se tedy jeví prvok *Tetrahymena thermophila*, zjištěné hodnoty v tomto testu naznačují toxické působení karbamazepinu na životní prostředí, dle klasifikace Persooneho a kol. dokonce riziko vysoké akutní toxicity (viz tabulka 23 a 24).

Tabulka 23: Systém klasifikace rizika pro vodní prostředí dle Persooneho a kol.

[55]

TU	Toxicita
< 0,4	žádná akutní toxicita
0,4 < TU < 1	mírná akutní toxicita
1 < TU < 10	akutní toxicita
10 < TU < 100	vysoká akutní toxicita
> 100	velmi vysoká akutní toxicita

Tabulka 24: Systém klasifikace rizika pro životní prostředí dle Knighteho a kol.

[56]

LC ₅₀ (mg/l)	Hodnocení
< 1	vysoce toxický vodním organismům
> 1 < 10	toxický vodním organismům
> 10 < 100	mírně toxický vodním organismům
> 100	relativně netoxický

Možnost toxicity při dlouhodobém vystavení i nižším koncentracím karbamazepinu je však ještě reálnější, obecně je chronická toxicita častějším problémem než toxicita akutní, měla by tedy být předmětem dalšího zkoumání [57].

Vliv karbamazepinu na různé testovací organismy byl zkoumán v rozličných studiích. Lüring a kolektiv v testu s korýšem *Daphnia pulex* prokázali, na rozdíl od experimentů této práce, mírný stimulační vliv karbamazepinu v koncentraci 1 µg/l, kdy se dafnie o něco rychleji vyvíjely a reprodukovaly než kontrolní jedinci, v koncentraci 100 µg/l byl zaznamenán 9% a při vystavení 200 µg/l 32% pokles míry růstu populace oproti kontrole [58].

Kim a kolektiv v testu imobilizace s korýšem *Daphnia magna* určili hodnotu 96hEC₅₀ 76,3 mg/l, v multigenerační studii s tímto organismem Dietrich a kolektiv zkoumali vliv nejen karbamazepinu jako samotné účinné látky, ale i ve směsi s dalšími léčivy (diklofenakem, ethinylestradiolem a metoprololem). Vliv na životní cyklus a morfologické parametry však nebyl při vystavení samotnému léčivu v koncentraci 0,50 µg/l prokázán ve více než jedné generaci. Testovaná směs léčivých látek zde nevykazovala silnější účinky na testovací organismus než jednotlivé účinné látky [59, 60].

Naopak Cleuvers prokázal v experimentu s *Daphnia magna* mnohem silnější efekt směsi léčiv než jednotlivých substancí. Zatímco samotný karbamazepin vykazoval 16% imobilizaci dafnií a kyselina klobifrová 1% imobilizaci, směs těchto léčiv zapříčinila imobilizaci dokonce 95 % dafnií [61].

Jos a kolektiv se taktéž zabývali účinky karbamazepinu na různé druhy organismů, v testu s hodnocením imobilizace *Daphnia magna* určili hodnoty 24hEC₅₀ 112,2 mg/l a 48hEC₅₀ 97,8 mg/l (*Daphnia magna* se tedy zdá být citlivějším druhem korýše k působení karbamazepinu než *Thamnocephalus platyurus*, u kterého jsme v našem experimentu získali hodnotu 24hLC₅₀ 563,5 mg/l), dále Jos a kolektiv hodnotili inhibici bioluminiscence bakterie *Vibrio fischeri* s těmito výsledky: 5minEC₅₀ 87,4 mg/l, (Kim a kolektiv při tomto obdobném testu určili hodnotu 5minEC₅₀ 52,5 mg/l), 15minEC₅₀ 78,4 mg/l a 60minEC₅₀ 64,0 mg/l, při experimentu, jenž sledoval ovlivnění růstu kořene *Alium cepa*, činila získaná hodnota 72hEC₅₀ 105,6 mg/l, přičemž redukce růstu kořene byla statisticky významná u koncentrací nad 23,6 mg/l, dále pak byla hodnocena inhibice růstu řas *Chlorella vulgaris*, kde byly stanoveny hodnoty: 24hEC₅₀ 111,0 mg/l a 48hEC₅₀ 36,6 mg/l [59, 62].

Ve studii ovlivnění růstu řasy *Desmodesmus subspicatus* Cleuvers určil hodnotu $72hEC_{50}$ 74 mg/l [61].

DeLorenzo a Fleming při testu s řasou *Dunaliella tertiolecta* pozorovali 42% redukci hustoty buňky testovacího organismu oproti kontrole [63].

Andreozzi a kolektiv se taktéž věnovali výzkumu inhibice růstu řas (v tomto případě *Ankistrodesmus braunii* a *Selenastrum capricornutum*), ta zde však oproti předešlým studiím prokázána nebyla [64].

U rostliny *Lemna minor* stanovil Cleuvers $7dEC_{50}$ 25,5 mg/l, v této práci jsme za zástupce producentů zvolili rostlinu *Sinapis alba* (respektive její semena), zjištěná hodnota $72hIC_{50}$ činí 232,7 mg/l, zdá se tedy, že oproti výše zmíněným zástupcům stejné trofické úrovně je inhibiční vliv karbamazepinu na tento organismus významně nižší [61].

Studovány byly i změny ve ventilaci a pohybu korýše *Gammarus pulex*, při koncentraci 10 ng/l bylo zaznamenáno zvýšení ventilace oproti kontrole i oproti koncentraci 1 ng/l, vyšší koncentrace karbamazepinu zapříčinily zvýšení pohybu testovacího organismu [65].

Kim a kolektiv se věnovali hodnocení akutní toxicity u korýše *Thamnocephalus platyurus* a ryby *Oryzias latipes*. V této práci nebyl zjištěn žádný toxický efekt při testu s korýšem, kde nejvyšší použitá koncentrace karbamazepinu činila 100 mg/l, což plně odpovídá i výsledkům našeho experimentu. U druhého testovacího organismu byla zjištěna hodnota $96hLC_{50}$ 45,87 mg/l, *Oryzias latipes* se tedy jeví jako citlivější druh k působení karbamazepinu než *Thamnocephalus platyurus* i *Daphnia magna* [66].

Oetken a kolektiv při svém experimentu s žížalíci *Lumbriculus variegatus*, pakomárem *Chironomus riparius* a plžem *Potamopyrgus antipodarum* neprokázali žádný akutní toxický účinek při testech s koncentracemi karbamazepinu v rozmezí 0,5 µg/l až 4 mg/l [67].

Důležitým faktorem působení karbamazepinu na organismy v životním prostředí je však také současná přítomnost dalších léčivých, ale i jiných chemických látek. Toxicita směsí je odhadnutelná jen velmi těžce a to jak na konkrétní organismus, tak ještě hůře na celý ekosystém. Chemická individua se mohou vzájemně antagonistovat, častěji se však jejich účinky sčítají či násobí (potencují), jako příklad zde byl již uveden Cleuvers a jeho experiment s *Daphnia magna* a vliv karbamazepinu a kyseliny klofibrové na její imobilizaci [61].

V životním prostředí je problematická nejen toxicita směsí, ale vlastně i jejich složení, to je dosti pravděpodobně velice proměnlivé a navíc není vyloučeno, že potencovat účinek ostatních látek mohou i chemické substance pod detekovatelnými koncentracemi.

Toxicita směsí je tedy dosud stále velkou neznámou a jistě si zaslouží pozornost v podobě zjišťování koncentrací jednotlivých látek v životním prostředí a též testování účinků směsí pomocí ekotoxikologických testů.

7. Závěr

V této práci jsme studovali vliv karbamazepinu jako samotné chemické substance a karbamazepinu, jenž byl součástí léčiva Timonil 300 retard. K testování jsme využili zástupce všech trofických úrovní, provedeny byly 2 testy toxicity semichronické a jeden test toxicity akutní.

U vícegeneračního testu toxicity s prvokem *Tetrahymena thermophila* jsme stanovili hodnotu střední inhibiční koncentrace $24hIC_{50} = 2,20$ mg/l (1,94-2,48 mg/l) u standardu karbamazepinu a hodnotu $24hIC_{50} = 3,93$ mg/l (3,49-4,42 mg/l) u karbamazepinu jako součásti léčiva.

U semichronického testu toxicity se semeny *Sinapis alba* jsme získali tyto výsledky: střední inhibiční koncentrace standardu léčivé látky činila $72hIC_{50} = 232,7$ mg/l (216,1-250,5 mg/l) a hodnota střední inhibiční koncentrace karbamazepinu jako léčivého přípravku pak byla $72hIC_{50} = 195,9$ mg/l (179,6-213,5 mg/l).

THAMNOTOXKIT FTM s testovacím organismem korýšem *Thamnocephalus platyurus* poskytl hodnotu střední letální koncentrace u karbamazepinu jako standardu $24hLC_{50} = 563,5$ mg/l (505,7-627,9 mg/l) a při testu s tabletou léčiva pak hodnotu $24hLC_{50} = 388,1$ mg/l (338,1-444,6 mg/l).

Nejcitlivějším druhem se dle dosažených výsledků zdá být prvok *Tetrahymena thermophila*.

8. Seznam použitých zkratk

24hLC ₅₀	Koncentrace, jež způsobí 50% úhyn testovacího organismu v 24hodinovém testu
96hLC ₅₀	Koncentrace, jež způsobí 50% úhyn testovacího organismu v 96hodinovém testu
24hIC ₅₀	Koncentrace, jež způsobí 50% inhibici testovacího organismu v 24hodinovém testu
72hIC ₅₀	Koncentrace, jež způsobí 50% inhibici testovacího organismu v 72hodinovém testu
5minEC ₅₀	Koncentrace, jež způsobí odpověď u 50 % testovacích organismů v 5minutovém testu
15minEC ₅₀	Koncentrace, jež způsobí odpověď u 50 % testovacích organismů v 15minutovém testu
60minEC ₅₀	Koncentrace, jež způsobí odpověď u 50 % testovacích organismů v 60minutovém testu
24hEC ₅₀	Koncentrace, jež způsobí odpověď u 50 % testovacích organismů v 24hodinovém testu
48hEC ₅₀	Koncentrace, jež způsobí odpověď u 50 % testovacích organismů v 48hodinovém testu
72hEC ₅₀	Koncentrace, jež způsobí odpověď u 50 % testovacích organismů v 72hodinovém testu
96hEC ₅₀	Koncentrace, jež způsobí odpověď u 50 % testovacích organismů v 72hodinovém testu
7dEC ₅₀	Koncentrace, jež způsobí odpověď u 50 % testovacích organismů v 7denním testu
AIPLP	Automatizovaný informační systém léčivých přípravků
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC ₅₀	Koncentrace, jež způsobí odpověď u 50 % testovacích organismů (střední efektivní koncentrace)
EDC	Endocrine disrupting compounds
FDA	Food and Drug Administration
IC ₅₀	Koncentrace, jež způsobí 50% inhibici testovacího organismu (střední inhibiční koncentrace)

ICM	Iodinated X-ray contrast media
LC ₅₀	Koncentrace, jež způsobí 50% úhyn testovacího organismu (střední letální koncentrace)
NCCOS	National Centers for Coastal Ocean Science
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
TU	Toxická jednotka

9. Literatura

1. Cunningham V. L. *et al.*: Effects of Human Pharmaceuticals on Aquatic Life: Next Steps, *Environ. Sci. Technol.* 40, 2006, s. 3456-3462.
2. Kümmerer K.: *Pharmaceuticals in the Environment Sources, Fate, Effects and Risks*, 3. vyd., Springer, Berlin 2008, 521 s.
3. Kotyza J. *et al.*: Léčiva – „nový“ environmentální polutant, *Chem. Listy* 103, 2009, s. 540-547.
4. Váňa M. *et al.*: Možnosti odstraňování vybraných specifických polutantů v ČOV, *VTEI* 52, 2010, s. 1-3.
5. Stříbrná E.: Ekologický monitor. Krátké zprávy ze zahraničních periodik., *EKO VIS MŽP. Informační zpravodaj* 13, 2003, [online] dostupné z: <http://www.mzp.cz/ris/vis-edice.nsf/5262baa1b2012f9cc125723b003a63ed/7f2f653d8eba4946c1257419002c26c6?OpenDocument&ExpandSection=3,-12> [cit. 19. 11. 2011].
6. [online] dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/Carbamazepine> [cit. 17. 11. 2011].
7. Lüllmann H., Mohr K., Wehling M.: *Farmakologie a toxikologie*, 2. vyd., Grada, Praha 2004, 728 s.
8. Lincová D. *et al.*: *Základní a aplikovaná farmakologie*, 2. vyd., Galén, Praha 2007, 672 s.
9. Zákon č. 378/2007 Sb., o léčivech a o změnách některých souvisejících zákonů (zákon o léčivech) § 2, odst. 1, Sbírka zákonů 2007, částka 115, s. 5343.
10. Zákon č. 378/2007 Sb., o léčivech a o změnách některých souvisejících zákonů (zákon o léčivech) § 2, odst. 4, Sbírka zákonů 2007, částka 115, s. 5344.

11. Hartl J., Palát K.: *Farmaceutická chemie I.*, 2. vyd., Karolinum, Praha 2007, 102 s.
12. Hampl F., Rádl S., Paleček J.: *Farmakochemie*, 2. vyd., VŠCHT, Praha 2007, 448 s.
13. Williams R. T.: *Human Pharmaceuticals: Assessing the Impact on Aquatic Ecosystems*, SETAC, Pensacola 2005, 368 s.
14. POSEIDON – Ternes T., detailní zpráva, [online] dostupné z: http://poseidon.bafg.de/servlet/is/2888/Final-Report-POSEIDON-Feb_2005.pdf?command=downloadContent&filename=Final-Report-POSEIDON-Feb_2005.pdf [cit. 8. 2. 2012].
15. [online] dostupné z: <http://www.enviweb.cz/clanek/chemlatky/84704/ppcps-farmarka-a-produkty-osobni-pece-a-vody> [cit. 19. 11. 2011].
16. Čabala R.: Přednášky ekotoxikologie UK v Praze, [online] dostupné z: <http://www.natur.cuni.cz/chemie/analchem/cabala/ke-stazeni/ekotoxikologie/soubor-prednasek-z-ekotoxikologie-zs2009> [cit. 17. 11. 2011].
17. Connell D. W.: *Introduction to Ecotoxicology*, 1. vyd., Wiley-Blackwell, Bodmin 1999, 170 s.
18. Vytlačilová J.: Přednášky monitorování životního prostředí, zimní semestr 2009/2010.
19. Vyhláška č. 376/2001 Sb., *o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů*, Příloha č. 1, *Definice nebezpečných vlastností odpadů a kritéria hodnocení nebezpečných vlastností odpadů*, Sbírka zákonů 2001, částka 143, s. 7956-7958.

20. Vyhláška č. 376/2001 Sb., *o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů*, Příloha č. 3, *Metody hodnocení nebezpečných vlastností odpadů*, Sbírka zákonů 2001, částka 143, s. 7960-7961.
21. Vyhláška č. 402/2011 Sb., *o hodnocení nebezpečných vlastností chemických látek a chemických směsí a balení a označování nebezpečných chemických směsí*, Sbírka zákonů 2011, částka 140, s. 5162-5165.
22. Směrnice Rady 67/548/EHS, *o sblížení právních a správních předpisů týkajících se klasifikace, balení a označování nebezpečných látek*, [online] dostupné z: www.schp.cz/schp/81625ced/chleg/knihovna/sr_67-548-ehs.rtf [cit. 6. 1. 2012].
23. Vyhláška č. 402/2011 Sb., *o hodnocení nebezpečných vlastností chemických látek a chemických směsí a balení a označování nebezpečných chemických směsí*, Příloha č. 6., Sbírka zákonů 2011, částka 140, s. 5256-5260.
24. Vyhláška č. 402/2011 Sb., *o hodnocení nebezpečných vlastností chemických látek a chemických směsí a balení a označování nebezpečných chemických směsí*, Příloha č. 1., Sbírka zákonů 2011, částka 140, s. 5166-5218.
25. Kočí V., Mocová K.: *Ekotoxikologie pro chemiky*, 1. vyd., VŠCHT, Praha 2009, 199 s.
26. Kočí V.: Význam testů toxicity pro hodnocení vlivu látek na životní prostředí, *Chem. Listy* 100, 2006, s. 882-888.
27. Souhrn údajů o přípravku Timonil 150/300/600 retard, [online] dostupné z: www.sukl.cz/download/spc/SPC107527.doc [cit. 14. 11. 2012].
28. SÚKL – léčiva s obsahem karbamazepinu v ČR, [online] dostupné z: [http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php?data%5Bsearch_for%5D=&data%5Bcode%5D=&data%5Batic_group%5D=&data%5Bmaterial%5D=karbam&data%5Bpath%5D=&data%5Breg%5D=&data%5Bradio%5D=none&data%](http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php?data%5Bsearch_for%5D=&data%5Bcode%5D=&data%5Batic_group%5D=&data%5Bmaterial%5D=karbam&data%5Bpath%5D=&data%5Breg%5D=&data%5Bradio%5D=none&data%5B)

- 5Bchbox%5D%5B%5D=marketability&data%5Brc%5D=&data%5Bwith_adv%5D=0&search=Vyhledat&data%5Blisting%5D=20 [cit. 21. 10. 2011].
29. FDA – léčiva s obsahem karbamazepinu v USA, [online] dostupné z: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm> [cit. 24. 10. 2011].
 30. [online] dostupné z: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00564> [cit. 4. 1. 2012].
 31. [online] dostupné z: <http://www.healthyplace.com/other-info/psychiatric-medications/carbamazepine-tegretol-full-prescribing-information/> [cit. 4. 1. 2012].
 32. Mikro-verze AISLP ČR 2011, stav k 1. 10. 2011
 33. SÚKL – spotřeba léčiv v ČR, [online] dostupné z: <http://www.sukl.cz/search.php?action=results&query=spot%C5%99eba+1%C3%A9%C4%8Div&x=0&y=0> [cit. 21. 10. 2011].
 34. Scheytt T. *et al.*: 1-Octanol/Water Partition Coefficients of 5 Pharmaceuticals from Human Medical Care: Carbamazepine, Clofibric Acid, Diclofenac, Ibuprofen, and Propyphenazone, *Wat. Air Soil Pollut.* 165, 2005, s. 3-11.
 35. Brun G. L. *et al.*: Pharmaceutically Active Compounds in Atlantic Canadian Sewage Treatment Plant Effluents and Receiving Waters, and Potential for Environmental Effects as Measured by Acute and Chronic Aquatic toxicity, *Environ. Tox. and Chem.* 25, 2006, s. 2163-2176.
 36. PROTOXKIT FTM Freshwater Toxicity Test with a Ciliate Protozoan, Standard Operational Procedure, MicroBioTests Inc., Nazareth, Belgium.
 37. Kočí V., Rakovický T., Švagr A.: Test semichronické toxicity se semeny *Sinapis alba*, VŠCHT, Praha 2001, [online] dostupné z:

- <http://www.vscht.cz/uchop/ekotoxikologie/dokumenty/Sinapis.htm>. [cit. 25. 10. 2011].
38. THAMNOTOXKIT FTM Freshwater Toxicity Screening Test, Standard Operational Procedure, MicoBiotestsInc., Gent, Belgium.
39. [online] dostupné z:
http://84.244.151.141/~persoone//images/slider/THAMNOTOXKIT_F.jpg
[cit. 29. 11. 2011].
40. Sedlák E.: Zoologie bezobratlých, 2. vyd., Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Brno 2002, 336 s.
41. [online] dostupné z: <http://tet.jsd.claremont.edu/about.php> [cit. 12. 1. 2012].
42. Eisen J. A. *et al.*: Macronuclear Genome Sequence of the Ciliate *Tetrahymena thermophila*, a Model Eukaryote, *PLoS Biol.* 4, 2006, [online] dostupné z: <http://www.plosbiology.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pbio.0040286> [cit. 12. 1. 2012].
43. [online] dostupné z:
<http://www.miami.muohio.edu/news/article/view/12718.html> [cit. 13. 1. 2012].
44. Jahodář L.: *Farmakobotanika semenné rostliny*, 2. vyd., Karolinum, Praha 2009, 268 s.
45. [online] dostupné z: <http://botany.cz/cs/leucosinapis-alba/> [cit. 16. 12. 2011].
46. [online] dostupné z:
<http://www.biodiversitylibrary.org/page/302466#page/411/mode/1up> [cit. 16. 12. 2011].
47. Sládeček V., Sládečková A., Ambrožová J.: *Thamnocephalus platyurus* jako testovací organismus, *Sborník konference „Toxicita a biodegradabilita odpadů a látek významných ve vodním prostředí“*, Chelčice, 1997, s. 96 - 99.

48. [online] dostupné z: <http://microbiotests.be/toxkits/thamnotoxkitf.pdf> [cit. 16. 12. 2011].
49. [online] dostupné z: [http://www.mzp.cz/C1257458002F0DC7/cz/stanoveni_ekotoxicity/\\$FILE/oodp-MP_ke_stanoveni_ekotoxicity_odpadu-2007.pdf](http://www.mzp.cz/C1257458002F0DC7/cz/stanoveni_ekotoxicity/$FILE/oodp-MP_ke_stanoveni_ekotoxicity_odpadu-2007.pdf) [cit. 16. 1. 2012].
50. Leclercq M. *et al.*: Presence and Fate of Carbamazepine, Oxcarbazepine, and Seven of Their Metabolites at Wastewater Treatment Plants, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 56, 2009, s. 408-415.
51. Ferenčík M., osobní sdělení – reálné hodnoty z monitorování Povodí Labe.
52. Zhao J.L. *et al.*: Occurrence and a Screening-Level Risk Assessment of Human Pharmaceuticals in the Pearl River System, South China, *Environ. Tox. and Chem.* 29, 2010, s. 1377-1384.
53. Maskaoui K., Zhou J. L.: Colloids as a Sink for Certain Pharmaceuticals in the Aquatic Environment, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 17, 2010, s. 898-907.
54. Fernández C. *et al.*: Occurrence of Pharmaceutically Active Compounds in Surface Waters of the Henares-Jarama-Tajo River System (Madrid, Spain) and a Potential Risk Characterization, *Sci. Total. Environ.* 408, 2010, s. 543-551.
55. Persoone G. *et al.*: A Practical and User-Friendly Toxicity Classification System with Microbiotests for Natural Waters and Wastewaters, *Environ. Toxicol.* 18, 2003, s. 395-402.
56. Knight D. J., Thomas M. B.: *Practical Guide to Chemical Safety Testing*, 1. vyd., iSmithers Rapra Publishing, Shrewsbury 2003, 448 s.
57. Šídlová P., Podlipná R., Vaněk T.: Cytostatická léčiva v životním prostředí, *Chem. Listy* 105, 2011, s. 8-14.

58. Lürling M., Sargent E., Roessink I.: Life-History Consequences for *Daphnia pulex* Exposed to Pharmaceutical Carbamazepine, *Environ. Toxicol.* 21, 2005, s. 172-180.
59. Kim Y. *et al.*: Aquatic Toxicity of Acetaminophen, Carbamazepine, Cimetidine, Diltiazem and Six Major Sulfonamides, and Their Potential Ecological Risks in Korea, *Environ. Intern.* 33, 2007, s. 370-375.
60. Dietrich S. *et al.*: Single and Combined Toxicity of Pharmaceuticals at Environmentally Relevant Concentrations in *Daphnia magna* – A Multigenerational Study, *Chemosph.* 79, 2010, s. 60-66.
61. Cleuvers M.: Aquatic Ecotoxicity of Pharmaceuticals Including the Assessment of Combination Effects, *Toxicol. Lett.* 142, 2003, s. 185-194.
62. Jos A. *et al.*: Ecotoxicological Evaluation of Carbamazepine Using Six Different Model Systems with Eighteen Endpoints, *Toxicol. Vitro* 17, 2003, s. 525-532.
63. DeLorenzo M. E., Fleming J.: Individual and Mixture Effects of Selected Pharmaceuticals and Personal Care Products on the Marine Phytoplankton Species *Dunaliella tertiolecta*, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 54, 2008, s. 203-210.
64. Andreozzi R. *et al.*: Carbamazepine in Water: Persistence in the Environment, Ozonation Treatment and Preliminary Assessment on Algal Toxicity, *Wat. Res.* 36, 2002, s. 2869-2877.
65. De Lange H. J., Peeters E. T. H. M., Lürling M.: Changes in Ventilation and Locomotion of *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda) in Response to Low Concentrations of Pharmaceuticals, *Hum. Ecol. Risk Assess.* 15, 2009, s. 111-120.

66. Kim JW. *et al.*: Acute Toxicity of Pharmaceutical and Personal Care Products on Freshwater Crustacean (*Thamnocephalus platyurus*) and fish (*Oryzias latipes*), *J. Toxicol. Sci.* 34, 2009, s. 227-232.
67. Oetken M. *et al.*: Effects of Pharmaceuticals on Aquatic Invertebrates. Part I. The Antiepileptic Drug Carbamazepine, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 49, 2005, s. 353-361.

10. Přílohy

10.1 Příloha I Přípravky obsahující karbamazepin obchodované v ČR

Název přípravku	Léková forma	Obsah karbamazepinu v mg	Počet tablet
Biston	POR TBL NOB	200	50
Neurotop 200 MG	POR TBL NOB	200	50
Neurotop retard 300	POR TBL PRO	300	50
Neurotop retard 600	POR TBL PRO	600	50
Tegretol CR 200	POR TBL PRO	200	50
Tegretol CR 400	POR TBL PRO	400	30
Timonil 150 retard	POR TBL PRO	150	50
Timonil 300 retard	POR TBL PRO	300	100
Timonil 300 retard	POR TBL PRO	300	50
Timonil 600 retard	POR TBL PRO	600	50

10.2 Příloha II Přípravky obsahující karbamazepin obchodované v USA

1. Carbamazepine

Léková forma	Obsah karbamazepinu v mg	Výrobce
POR TBL NOB	100	Torrent Pharmaceuticals
	200	Torrent Pharmaceuticals, Taro, Apotex
	300	Torrent Pharmaceuticals
	400	Torrent Pharmaceuticals
POR TBL PRO	100	Taro
	200	Taro
	400	Taro
POR CPS PRO	100	Nostrum
	200	Nostrum
	300	Nostrum
POR TBL MND	100	Taro, Torrent Pharmaceuticals
	200	Taro
POR SUS	100/5ml	Wockhardt

2. Carbatrol

Léková forma	Obsah karbamazepinu v mg	Výrobce
POR CPS PRO	100	Shire
	200	
	300	

3. Epitol

Léková forma	Obsah karbamazepinu v mg	Výrobce
POR TBL NOB	200	Teva
POR TBL MND	100	Teva

4. Equetro

Léková forma	Obsah karbamazepinu v mg	Výrobce
POR CPS PRO	100	Validus Pharmaceuticals
	200	
	300	

5. Tegretol

Léková forma	Obsah karbamazepinu v mg	Výrobce
POR TBL NOB	200	Novartis
POR TBL MND	100	Novartis
POR SUS	100/5ml	Novartis

6. Tegretol-XR

Léková forma	Obsah karbamazepinu v mg	Výrobce
POR TBL PRO	100	Novartis
	200	Novartis
	400	Novartis

7. Teril

Léková forma	Obsah karbamazepinu v mg	Výrobce
POR SUS	100/5ml	Taro

10.3 Příloha III Příklady generických přípravků karbamazepinu

Apo-Carbamazepine	Carmaz	Kodapan	Taro-Carbamazepine
Atretol	Carmine	Lexin	Taro-Carbamazepine Cr
Biston	Carmine CR	Macrepan	Taver
Calepsin	Carpaz	Mazepine	Tegol
Camapine	Carzepin	Mazetol	Tegretal
Carbadac	Carzepine	Neugeron	Tegretol
Carbagamma	Convuline	Neurotol	Tegretol Chewtabs
Carbamazepin	Degranol	Neurotop	Tegretol CR
Carbamazepine	Eleptin	Neurotop Retard	Tegretol-S
Carbamezepine	Epileptol	Nordotol	Tegretol-XR
Carbatol	Epileptol CR	Novo-Carbamaz	Telesmin
Carbatrol	Epitol	Nu-Carbamazepine	Temporol
Carbazene	Equetro	Panitol	Temporal Slow
Carbazep	Finlepsin	Sirtal	Teril
Carbazepine	Foxalepsin	Stazepin	Timonil
Carbazina	Foxalepsin Retard	Stazepine	Timonil Retard
Carbazine	Hermolepsin	Tardotol	Zept
Carbelan	Karbamazepin		

10.4 Příloha IV Spotřeba léčiv s obsahem karbamazepinu v ČR

1. Dodávky léčiv s obsahem karbamazepinu do zdravotnických zařízení dle SÚKLu

Rok	Počet balení
2003	642 831
2004	589 392
2005	625 096
2006	578 339
2007	610 909
2008	552 890
2009	442 713
2010	437 884

2. Spotřeba léčiv s obsahem karbamazepinu v ČR dle AISLPu

Přípravek	Rok 2009	Rok 2010
Celkem	442 713	438 472
Biston 50 tbl	86 974	77 068
Neurotop 200 MG 50 tbl	27 231	29 475
Neurotop retard 300 50 tbl	61 444	67 481
Neurotop retard 600 50 tbl	13 131	14 358
Tegretol CR 200 50 tbl	95 007	91 562
Tegretol CR 400 30 tbl	84 625	86 076
Timonil 150 retard 50 tbl	17 144	17 219
Timonil 300 retard 100 tbl	18 247	19 099
Timonil 300 retard 50 tbl	27 354	25 056
Timonil 600 retard 50 tbl	11 556	11 078

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

Autor diplomové práce: Musilová Eva

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jitka Vytlačilová, Ph.D.

Název diplomové práce:

Vliv léčiva na životní prostředí

Karbamazepin je léčivo ze skupiny antiepileptik, používá se však i v dalších indikacích, především pak k terapii neuralgie trigeminu. Je často detekovanou látkou v životním prostředí. V této práci byla hodnocena ekotoxicita léčivého přípravku Timonil 300 retard v porovnání se standardem karbamazepinu, k tomu byly využity následující testy: vícegenerační test s prvokem *Tetrahymena thermophila*, test semichronické toxicity se semeny *Sinapis alba* a THAMNOTOXKIT FTM s korýšem *Thamnocephalus platyurus*. Nejcitlivějším organismem v tomto experimentu byl prvok *Tetrahymena thermophila*.

Klíčová slova: ekotoxicita, karbamazepin, *Tetrahymena thermophila*, *Sinapis alba*, *Thamnocephalus platyurus*

Abstract

Charles University in Prague

Pharmaceutical Faculty in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Botany and Ecology

Candidate: Musilová Eva

Consultant: RNDr. Jitka Vytlačilová, Ph.D.

Title of thesis:

Drug influence on the environment

Carbamazepine is a drug from a group of antiepileptic, however it is used in other indications, especially in the treatment of trigeminal neuralgia. It is often detected substance in the environment. The ecotoxicity of medicinal product Timonil 300 retard was evaluated in comparison with the standard of carbamazepine in this thesis, the following tests were used to: multigenerational test with a protozoan *Tetrahymena thermophila*, test of semichronic toxicity with *Sinapis alba* seeds and THAMNOTOXKIT FTM with a crustacean *Thamnocephalus platyurus*. The protozoan *Tetrahymena thermophila* was the most sensitive organism in this experiment.

Keywords: ecotoxicity, carbamazepine, *Tetrahymena thermophila*, *Sinapis alba*, *Thamnocephalus platyurus*